

ELTE Doktori Iskola
Evolúciógenetika, evolúciós ökológia, konzervációbiológia program
Programvezető: Dr. Szathmáry Eörs, akadémikus, egyetemi tanár

A csirkék fertőző bursitisét okozó vírustörzsek genetikai diverzitása és a virulencia változás genetikai háttere

Doktori értekezés

Mató Tamás

Témavezető: Dr Lomniczi Béla, az állatorvos tudományok doktora
Tudományos tanácsadó
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

Készült:
az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézetében
és a CEVA-PHYLAXIA ZRT. Virologiai Fejlesztési Igazgatóságán

2009

Tartalomjegyzék

	oldal
1. Bevezetés	1
1.1 A betegség története	1
1.2 A betegség kórokozójának molekuláris biológiája	5
1.3 Az IBD vírusok antigenitásbeli és filogenetikai kapcsolatai	8
1.3.1 Antigenitásban megnyilvánuló különbségek vizsgálata (szerológiai módszerekkel)	8
1.3.2 Genetikai alapokon nyugvó törzscsoportosítás -restrikciós enzimek alkalmazásával	9
1.3.3 Genetikai alapokon nyugvó törzscsoportosítás –szekvencia-analízis alapján	11
1.4 A virulencia molekuláris biológiai alapjai	13
1.4.1 Nem-limfoid sejtenyészetekhez való adaptálódás	13
1.4.2 Virulencia	16
2. Célkitűzések	19
3. Anyagok és Módszerek	20
3.1 Vírus RNS tisztítás és reverz transzkripció	20
3.2 Nested PCR reakció	20
3.3 RFLP analízis	21
3.4 Szekvencia analízis	22
3.5 Mezei vírusok izolálása SPF csirkében	22
3.6 Mezei vírusok izolálása embrionált SPF tyúktóban	22
3.7 Vakcinavírusok felszaporítása primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészetben	23
3.8 IBD vírusszuszenziók titrálása embrionált SPF tyúktóban	23
3.9 IBD vírusszuszenziók titrálása primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészetben (mikrolemezen végzett vizsgálat)	24
3.10 IBD vírusszuszenziók plakktitrálása primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészetben	25
3.11 IBDV specifikus ellenanyagok szintjének meghatározása vírusneutralizációs teszttel	25
3.12 A különböző vakcinacsoportok sejt kultúra-adaptáltságának vizsgálata	26
3.13 1977 és 1981 között Magyarországon izolált IBDV törzsek szaporodási képességének vizsgálata nem-limfoid sejtenyészetben	26
3.14 Állatkísérletek	27

3.14.1	1978-ban Magyarországon izolált IBDV törzs virulenciájának vizsgálata csirkében.....	27
3.14.2	1997-ben Magyarországon izolált IBDV törzsek virulenciájának vizsgálata csirkében.....	27
3.14.3	2004-ben Dél-Afrikában izolált IBDV törzs virulenciájának vizsgálata csirkében.....	28
3.14.4	A különböző vakcinacsoportok összehasonlító vizsgálata SPF csirkében.....	28
4.	Eredmények.....	30
4.1	Molekuláris biológiai módszer kidolgozása a mezei IBDV törzsek kimutatására és egymástól való elkülönítésére.....	30
4.1.1	Nested PCR kidolgozása	30
4.1.2	A vírus kimutatási módszer érzékenysége	31
4.1.3	RFLP analízis	33
4.2	Magyarországon 1975-1981 között izolált IBDV törzsek filogenetikai vizsgálata ...	39
4.2.1	Vizsgált vírusok.....	39
4.2.2	Filogenetikai eredmények	39
4.2.3	1977 és 1981 között Magyarországon izolált IBDV törzsek szaporodási képességének vizsgálata nem-limfoid sejtenyészetben.....	43
4.2.4	1978-ban Magyarországon izolált IBDV törzs virulenciájának vizsgálata csirkében.....	43
4.3	Magyarországon 1995-2008 között izolált IBDV törzsek filogenetikai vizsgálata ...	43
4.3.1	Vizsgált vírusok.....	43
4.3.2	Filogenetikai eredmények	44
4.3.3	1997-ben Magyarországon izolált IBDV törzsek virulenciájának vizsgálata csirkében.....	47
4.4	Dél-Afrikai variáns IBDV törzsek jellemzése.....	47
4.4.1	Vizsgált törzsek	47
4.4.2	Filogenetikai eredmények	47
4.4.3	2004-ben Dél-Afrikában izolált IBDV törzs virulenciájának vizsgálata csirkében.....	51
4.5	A kereskedelmi forgalomban kapható IBDV vakcina törzsek összehasonlítása	53
4.5.1	Vizsgált vakcinák	53
4.5.2	Filogenetikai eredmények	54
4.5.3	A különböző vakcinacsoportok sejt kultúra-adaptáltságának vizsgálata	60

4.5.4	Sejtkultúra-adaptált vakcinák természetes körülmények között revertálódott változatainak vizsgálata.....	61
4.5.5	A különböző vakcinacsoportok összehasonlítása SPF csirkében.....	62
5.	Megbeszélés	65
6.	Köszönetnyilvánítás	79
7.	Összefoglalás.....	80
8.	Summary.....	81
9.	Felhasznált irodalom	82
10.	A témához kapcsolódó publikációk	89
11.	Függelék.....	90
	A dolgozatban felhasznált IBDV törzsek GenBank-i azonosítói.....	90

1. BEVEZETÉS

1.1 A betegség története

A csirkék fertőző bursitisét (*infectious bursal disease, IBD*) elsőként, 1962-ben az Egyesült Államokban, a Delaware állambeli Gumboro-ban írták le, mint vesegyulladást okozó betegséget (*Cosgrove, 1962*). Hamar kiderült azonban, hogy a betegség főleg a *bursa Fabricii*-ben okoz jelentős károsodás, ami az állat immunrendszerének legyengüléséhez vezet. A betegség egyike a világ baromfiiparát sújtó, és öt évtizedes története ellenére az állatorvostudomány számára napjainkban is nagy kihívást jelentő, gyors terjedési képességű fertőző betegségeknek.

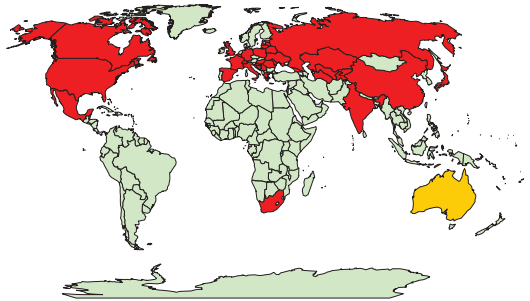
A betegség járványtani jelentőségét gyorsan felismerték, és megállapították, hogy a vírus okozta kórkép főképpen a 3-6 hetes csirkeállományokban idéz elő megbetegedéseket és okoz elhullást, a bursa éretlen B-limfocitáiban való elszaporodást követő virémia által. Az állatok a fertőződést követő 2.-3. napon bágyadtak lesznek, tollaikat felborzolják, sokuknál híg hasmenés is megfigyelhető. A 3-4 napig tartó betegséget túlélő állatok klinikailag hamar felépülnek. A 3 hetesnél fiatalabb csirkékben a fertőződés legtöbbször klinikai tünetekben nem nyilvánul meg (inapparens fertőzés), ugyanakkor súlyos, akár az állat egész életére szóló immunsuppressziót vált ki. Ezekre az állományokra csökkent humorális immunválasz képesség jellemző, ami fokozott érzékenységet okoz más kórokozókval való fertőződésre, mint például a baromfipestis vírus (*Newcastle Disease Virus*), fertőző bronchitis vírus (*Infectious Bronchitis Virus*), fertőző laryngotracheitis vírus (*Infectious Laryngotracheitis Virus*), valamint *Salmonella* törzsek, továbbá számos más másodlagos kórokozó, mint például az *Escherichia coli*. Ezek a kórokozók akár fatális légző- és emésztőszervrendszeri megbetegedésekhez vezethetnek az immunsuppresszált állatban. Az IBDV fertőződés következménye -amely klinikailag észlelt vagy elhullásokban megnyilvánuló megbetegedéstől függetlenül is jelentkezhet-, a termelési mutatók romlása (a gyakoribb fakultatív kórokozók okozta fertőzés következtében tapasztalható gyengébb növekedés és rosszabb takarmányhasznosítás miatt). Ezen túl az állatok immunválasz készsége csökken olyan súlyos fertőzőbetegségek elleni vakcinákkal szemben, mint a baromfipestis és a fertőző bronchitis. A betegség e két patotípusban (inapparens, illetve klinikai) való megjelenése a *bursa Fabricii* életkorfüggő funkcionális érettségével van szoros összefüggésben.

A vírus a bursán kívül képes más limfoid szervekben is szaporodni, mint a tímusz, lép és *caecalis tonsilla*, de ezekben maradandó elváltozást nem okoz.

A kórokozónak vírusneutralizációs teszttel két szerotípusát különítették el. Az I-es szerotípusú törzseket főleg csirkéből izolálták, de találtak ilyen törzseket kacsában, libában és struccokban is (Wang és mtsi, 2007). Ebbe a szerotípusba tartozik az összes csirkére patogén vírustörzs, ugyanakkor ezek a törzsek más állatfajban nem okoznak megbetegedést. A II-es szerotípusú törzseket pulykákból izolálták és ezek sem csirkékben, sem pedig pulykában nem okoznak megbetegedést (Ismail és mtsi, 1988). IBDV-vel szemben termelődött ellenanyagokat mutattak ki számos más vadmadárfajból is, melyek szerotípusa nem ismert (Campbell, 2001).

A 70-es években a betegség gyorsan szétterjedt a világ számos országban (1. ábra). Európában először az Egyesült Királyságban izolálták 1970-ben (Bygrave és Faragher, 1970). Magyarországon először 1975-ben - súlyos tüneteket és magas elhullást mutató

hathetes tojóállományból - izolálta a vírust Palya Vilmos (Palya és mtsi, 1981). Ausztráliában, 1972-ben izoláltak először IBD vírust, ami az Amerikában leírtakhoz képest alacsonyabb patogenitású volt és antigenitásban különbözött a többi addig ismert, úgynevezett

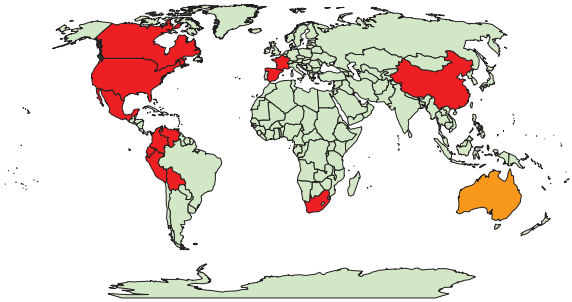


1. ábra A klasszikus virulens törzsek elterjedése a világon

klasszikus virulens törzstől. A későbbi genetikai vizsgálatok feltárták, hogy az ausztrál törzsek genetikailag különböznek a világ más tájain izolált IBDV törzsektől (Sapats és Ignjatovic, 2000).

Már az 1960-as évek végétől kezdődően alkalmaztak mezei vírustörzsekből (embrionált tyúktojásban és csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészetben végzett többszöri átoltással) legyengített, élő vírustörzseket vakcinaként, melyekkel a betegség kártétele megelőzhető volt. A helyzet 1985-ben változott meg, amikor az Egyesült Államokban -vakcinázott farmokról-, olyan **antigén variánsokat** izoláltak, amelyek képesek voltak áttörni a klasszikus virulens vírusok által nyújtott védelmet. Ezek a vírusok súlyos bursasorvadást, ezáltal immunszuppressziót váltanak ki, de a klasszikus virulens törzsekkel ellentétben nem okoznak sem ödémával kísért bursagyulladás, sem pedig elhullást (Sharma és mtsi, 1989). Attól függően, hogy a fertőzés milyen életkorban történik, az immunszuppresszió lehet súlyos tartós

vagy átmeneti. Az Egyesült Államokbeli megjelenésük után az amerikai kontinens számos országában kimutattak variáns törzseket, így Kanadában (Ojkic és mtsi, 2007), Közép- és Dél-Amerika több országában, mint

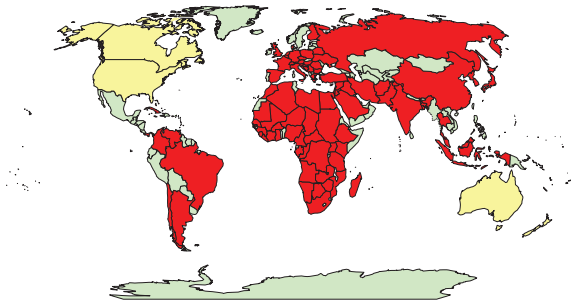


2. ábra Az antigén variáns törzsek elterjedése a világon

például Mexikó, Kolumbia, Venezuela, Peru és Bolívia (Jackwood és Sommer-Wagner, 2007). Az amerikai kontinensen kívül még találtak variáns törzseket Kínában (Cao és mtsi, 1998), Dél-Afrikában (Jackwood és Sommer-Wagner, 2007), továbbá Francia- és Spanyolországban is (2. ábra). Az európai variáns törzseket -az amerikaiakhoz hasonlóan- gyenge termelési eredményeket mutató broiler állományokból izolálták, amelyek nem mutatták az európai nagyvirulenciájú törzsekre jellemző klinikai tüneteket és magas elhullást. Ezek a törzsek döntő részben az amerikai variánsokkal közeli rokonságban álló, de azoktól jól elkülönülő filogenetikai csoportot alkotnak (Jackwood és mtsi, 2006). A fennálló genetikai különbség felveti annak valószínűségét, hogy e törzsek amerikai társaiktól függetlenül, Európában alakultak ki. Ausztráliában 1994-ben és 1995-ben, számos farmon, a vakcinázás ellenére áttöréseket figyeltek meg. Az ezeken a farmokon izolált törzsek vizsgálatával kimutatták, hogy azok az amerikai variáns törzsekhez hasonlóan antigenitásban különböznek a klasszikus ausztrál vírusoktól, ezért ezeket a törzseket is variánsoknak nevezték el. A filogenetikai vizsgálatok azonban megállapították, hogy ezek genetikailag nem rokonok az amerikai variánsokkal (Sapats és Ignjatovic, 2000). Napjainkban, az Egyesült Államokban, a variáns vírusokból készített vakcinák használata ellenére, több esetben izolálnak új, antigenitásukban az eddigi variáns vírusoktól különböző vírusokat, melyek képesek az alkalmazott vakcinák nyújtotta immunitást áttörni. Számos baromfityényszító cég a telepeiken előforduló variáns vírusokból készített, úgynevezett autogén vakcinákkal próbál védekezni ezen újabb törzsekkel szemben (Jackwood és Sommer-Wagner, 2005).

1986-ban Hollandiában, 1988-ban az Egyesült Királyságban, majd nem sokkal ezután Európa számos országában új IBDV törzsek jelentek meg, melyek az amerikai társaikhoz hasonlóan szintén képesek voltak áttörni az addig alkalmazott vakcinákkal kialakított maternális

(passzív) védelmet. Ezek a törzsek jelentős elhullást okoztak, de esetükben lényeges antigenitásbeli különbséget sem sikerült kimutatni a klasszikus virulens törzsekhez képest (Chettle és mtsi, 1989, van den Berg és mtsi, 1991). A passzív védelem áttörését a vírusok virulenciájának



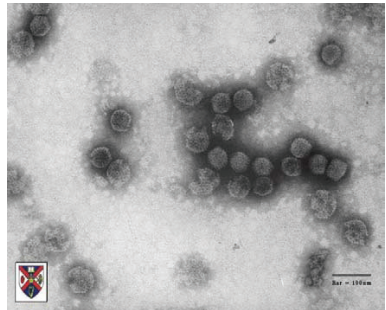
3. ábra A nagy virulenciájú törzsek elterjedése a világon
Pirossal az érintett, citromsárgával a mentes területeket jelöltük

fokozódásával magyarázták, ezért **nagyvirulenciájú törzseknek** (very virulent, vvIBDV) nevezték el őket. Az európai nagyvirulenciájú törzsek 5-25% elhullással járó betegséget okoznak broiler állományokban, de tojóhibridekben az elhullás elérheti 30-70%-ot is. Az általuk okozott klinikai tünetek megegyeznek a klasszikus virulens vírusokra jellemzővel, de a betegség lefolyása jóval gyorsabb és súlyosabb, továbbá ezek a törzsek képesek fiatalabb csirkékben (10-14 napos) is magas elhullással járó megbetegedést okozni. A bursában hasonló elváltozások jelentkeznek, mint a klasszikus virulens törzsek esetében, de súlyosabb formában jelentkező ödémával, vérzésekkal és elhalással. A bursán kívül más limfoid szervekben is szaporodnak, ahol a klasszikus virulens törzsekkel ellentétben képesek súlyos elváltozásokat előidézni, így például tímusz sorvadást. A virémia után a fertőzés generalizálódik és a vírus véralvadást befolyásoló hatása miatt a beteg állatban testszerte vérzések jelentkeznek. A nagyvirulenciájú törzsek Európa után gyorsan elterjedtek Ázsiában (Nunoya és mtsi, 1992; Cao és mtsi, 1998), Afrikában (Zierenberg és mtsi, 2000), majd Dél-Amerikába (Di Fabio és mtsi, 1999) is eljutottak (3. ábra). Jelenleg csak Észak-Amerikában és Ausztráliában nem mutattak még ki nagyvirulenciájú törzseket. A nagyvirulenciájú törzsek megjelenésével az addig uralkodó klasszikus virulens törzsek fokozatosan eltűntek az állományokból.

Összegezve tehát, az IBD vírusokat három fő csoportra oszthatjuk: (i) ún. *klasszikus virulens törzsek* (az elsőként leírt és a hozzájuk genetikailag, szerológiailag, valamint a kiváltott kórkép alapján is hasonló törzsek); (ii) ún. *variáns törzsek* (antigenitásban jelentősen különböznek a klasszikus virulens törzsektől, valamint klinikai tünetek nélkül okoznak immunszuppressziót); (iii) ún. *nagyvirulenciájú törzsek* (antigenitásban csak kissé különböznek a klasszikus törzsektől, de lényegesen nagyobb morbiditás és mortalitás jellemző rájuk). Az ausztráliai törzsek a fentiekől teljesen különálló csoportot alkotnak.

1.2 A betegség kórokozójának molekuláris biológiája

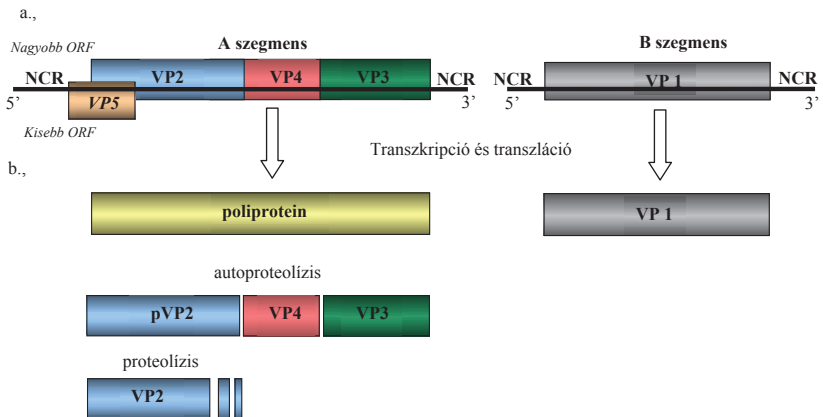
A kórokozó *Birnaviridae* család *Avibirnavirus* genusába tartozó, burok nélküli, 55-60 nm átmérőjű, ikozaédes szimmetriájú, egyrétegű kapsziddal rendelkező, duplaszálú RNS vírus (Dobos és mtsi, 1979; 4. ábra). A vírus genomja két szegmensből áll. A nagyobb genomszegmens - az A-jelű - 3261 nukleotid hosszúságú és rajta két nyitott leolvasási keret található (ORF). A nagyobb ORF monocisztronos szerkezetű, és egy 110 kDa nagyságú poliproteint kódol, ami autoproteolízissel három fehérjére hasad:



Prof. Steward McNulty, Queen's University of Belfast

4. ábra Az IBDV elektronmikroszkópos képe

pVP2, VP4 és VP3 (Hudson és mtsi, 1986; 5. ábra). A pVP2 további proteolitikus hasítása során alakul ki a vírus fő kapszidfehérjéje, ami lehetővé teszi a víruskapszid összeszerelődését. Ezt az érési folyamatot a VP3 fehérje irányítja (Chevallier és mtsi, 2002).

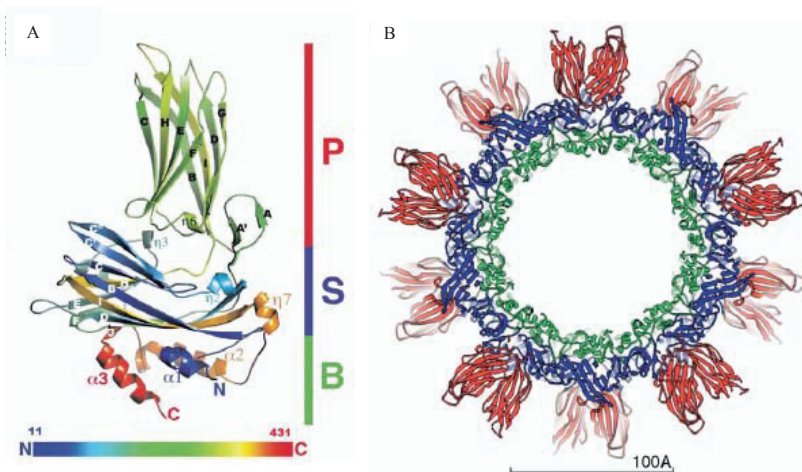


5. ábra Az IBDV genom felépítése (a) és fehérjéinek szintézise (b).
NCR: nem kódoló régió ORF: nyitott leolvasási keret

A VP4 a vírus által kódolt szerin-proteáz, ami a poliprotein autoproteolízisét végzi (*Sanchez és Rodriguez, 1999*). A VP4 nem épül be a virionokba, hanem a sejt citoplazmájában vékony csőszerű képleteket hoz létre. Ezeknek a képleteknek a funkciója jelenleg még ismeretlen (*Granzow és mtsi, 1997*).

A VP3 a VP2-vel együtt építi fel a kapszidot oly módon, hogy a VP2 fehérjék a kapszid külső rétegét alkotják, míg a VP3 a kapszid belső rétegét. A VP3 C-terminálisa rendelkezik RNS kötő képességgel is, amivel a vírusgenomhoz kötődve elősegíti a genom kapszidba kerülését (*Tacken és mtsi, 2002*). Ezen felül képes a vírus polimerázához (VP1) is kapcsolódni, elősegítve a polimeráz kapszidba történő becsomagolódását (*Lombardo és mtsi, 1999*). Ezek alapján elmondható, hogy a VP3 a virion felépülésének fő irányítója (*scaffolding protein*).

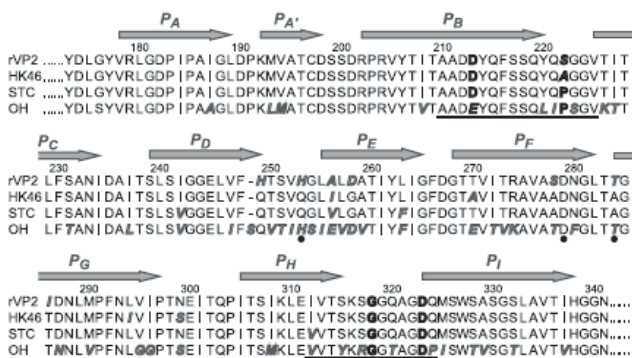
A víruskapszidban a VP2 fehérje homotrimerek formájában van jelen. A VP2 röntgenkristallográfiás vizsgálata során megállapították, hogy a fehérje három fő doménból épül fel: az alap (base, B), a héj (shell, S) és a nyúlvány (projection, P). A „B” és az „S” domént a fehérje konzervatív, N- és C- terminális szakaszai alkotják. A „B” domén a VP3-mal való kapcsolódásért felelős, az „S” domén alkotja a víruskapszid külső felszínét. A „P” domén a külső felszínből kiálló nyúlvány, ez tartalmazza a VP2 hipervariábilis régióját, amit nyolc β -lemez és az ezeket összekapcsoló hurkok építenek fel (6 ábra; *Coulibaly és mtsi, 2005*).



6. ábra A.) VP2 fehérje másodlagos szerkezeti doménjai: B (alap), S (héj), P (nyúlvány). B.) IBDV szubvirális részecske. 20db VP2 trimer alkotja.

Coulibaly és mtsi, 2005

Az IBDV törzsek közötti nukleotid (és aminosav) eltérések a VP2 fehérje 206-350 aminosavig terjedő szakaszán koncentrálódnak, ezt a régiót hívják hipervariábilis régiónak. A VP2 fehérje e részlete a vírus elleni immunválaszban is kitüntetett szerepű, hiszen a fehérje e régióján található legalább két fő konformáció-függő epitóp, amelyek a vírus ellen termelődő neutralizáló ellenanyagok nagy részének fő kapcsolódási helyei (Fahey és mtsi, 1989). Ezek a fő epitópok a hipervariábilis régió 212-224-es, valamint a 314-325-ös aminosavai között található hidrophil régiókra lokalizálhatók (Azad és mtsi, 1987; 7. ábra: VP2 fehérje P_{BC} és P_{HI} hurkai). További két hidrophil hurkot találtak a P domén felszínén, amelyek a vírus sejt spektrumának kialakításában játszanak fontos szerepet (a P_{DE} hurok a 249-254-es aminosavak között, a P_{FG} pedig a 282-287-es aminosavak között található). Ezeken a hurkokon vannak a 253-as és 284-es aminosavak, amelyek a vírus limfoid, illetve nem-limfoid sejteken található receptorokhoz való kötődésében játszanak központi szerepet (Coulbaly és mtsi, 2005).



7. ábra A VP2 „P” (nyúlvány) doménjét képező polipeptidlánc aminosav szekvenciája és a különböző aminosavakhoz rendelt funkciók.

Az ábrán négy reprezentatív IBDV törzs aminosav szekvenciája szerepel (rVP2: Bursine 2 vakcina törzs, HK46: nagyvirulenciájú törzs, STC: klasszikus virulens törzs, OH: II-es szerotípusú IBDV). A nyílak a β -lemez szerkezeti részeket jelölik, amelyeket hurkok kapcsolnak össze. Aláhúzott aminosavak: neutralizáló ellenanyag-kötőhelyek, fekete pontok: nem-limfoid sejtenyészethez való adaptálódásban szerepet játszó aminosavak, szaggatott aláhúzás: szerin-gazdag heptapeptid, dőlt betű: aminosav változások.

A hipervariábilis régió a 206-350. aminosavak közötti szakasz.

Lee és mtsi, 2006

Szintén a P doménen található a P₁ β -lemez területén a 326-332-es aminosavak között, egy szerin-gazdag heptapeptid régió (SWSASGS), ami konzervatív a legtöbb virulens IBDV

törzsben (7. ábra; *Heine és mtsi, 1991*). A VP2 nemcsak szerkezeti fehérjeként jelentős, de rendelkezik apoptózis kiváltó lépcsővel is, ezáltal hozzájárul a vírus sejtől való kiszabadulásához (*Yao és Vakharia, 2001*).

A kisebb ORF, ami az „A” genomszegmens 5'-részén található, részlegesen átfed a nagyobb ORF 5'-részével, attól egy nukleotiddal eltolt leolvasási keretben. Ez az ORF egy 17 kDa nagyságú, cisztein gazdag membránfehérjét kódol (VP5), ami nem épül be a kapszidba (nem strukturális (NS) fehérje), de minden IBDV által megfertőzött sejtben jelen van (*Mundt és mtsi, 1997*). E fehérje aminosav szerkezete nagyon konzervatív az I-es szerotípusú vírusok között (a törzsek közti hasonlósága nagyobb, mint 95%). A vírus szaporodásához sejtenyészetben ugyan nem szükséges e fehérje jelenléte, de a vírustiter jelentősen, akár 200-szor alacsonyabb lesz, mint a VP5 jelenlétében (*Mundt és mtsi, 1997*). Ennek hátterében az áll, hogy a VP5 fehérje a sejt membránjában felhalmozódva - valószínűleg a membrán áteresztőképességének fokozásával - sejtízist indukál, elősegítve ezzel az érett virionok kijutását a sejtől (*Lombardo és mtsi, 2000*). A VP5 e citolitikus tulajdonsága miatt, minden bizonnyal jelentős szerepet játszik a bursában található B-limfociták elpusztításában, ami a bursa funkcionális károsodásához és ezáltal immunszuppresszióhoz vezet (*Yao és mtsi, 1998, Yao és Vakharia, 2001*).

A kisebb genomszegmens („B”) 2827 bp hosszú és egyetlen ORF-jén egyetlen fehérjét kódol (VP1), a vírus 97 kDa nagyságú RNS-függő RNS polimerázát (5. ábra). Ez az enzim a polimeráz funkcionálisan túl, a virális mRNS szintézise során a translációhoz szükséges *cap* struktúra kialakításában is szerepet játszik az mRNS 5'-végén (*Spies és mtsi, 1987, Spies & Müller, 1990*). Képes mind az „A”, mind pedig a „B” genomszegmens 5' és 3' végein található nem kódoló régiókhoz kötődni (5. ábra) majd a két szegmenst gyűrűvé zárva tovább növelni a duplaszállú RNS-genom stabilitását (*Müller és Nitschke, 1987*).

1.3 Az IBD vírusok antigenitásbeli és filogenetikai kapcsolatai

1.3.1 Antigenitásban megnyilvánuló különbségek vizsgálata (szerológiai módszerekkel)

Az amerikai antigén variáns IBD vírusok megjelenését követően, az újonnan izolált vírusok antigenitásbeli különbségeit keresztneutralizációs teszttel vizsgálták. E módszerrel kimutatták, hogy a klasszikus virulens törzsekkel vakcinázott csirkék savója csak részlegesen képes neutralizálni a variáns vírusokat, ezért nem képesek a vakcinák megvédeni az immunizált csirkéket egy variáns vírushatástól (*Ismail és mtsi, 1990*). A különböző farmokról izolált

variáns vírusok antigenitásának összehasonlítása során kiderült, hogy egyes variáns törzsek antigenításban jelentősen különböznek a többiektől, ezek alapján csoportokba is sorolták őket (Variáns E, Variáns A, GLS csoport). A keresztneutralizációs vizsgálatok nagyon időigényesek és költségesek, mivel elvégzésükhöz először a vizsgálni kívánt vírust izolálni kell, majd *in vitro* fel kell szaporítani, ami a vírusok egy részének esetében sikertelen is lehet. Emellett az *in vitro* szaporítás során a vírus antigenitása megváltozhat. Ezek után következhet a felszaporított vírus elleni antiszérum termelése, ami szintén nagyon időigényes folyamat. Snyder és munkatársai (1992) ezért olyan monoklonális antitestekből álló panelt dolgoztak ki, amellyel az előzőleg felállított csoportok egymástól jól és gyorsan elkülöníthetők AC-ELISA (antigen capture- enzyme-linked immunosorbent assay) vizsgálattal. E panelben használt ellenanyagok által felismert epitópot a VP2 fehérje hipervariábilis részén már feltérképezték. Ez alapján megjósolható, hogy egy aminosavváltozás nagy valószínűség szerint okozhat-e epitóp változást, ami a vírus antigenitásának megváltozásával jár (Letzel és mtsi, 2007).

A nagyvirulenciájú törzsek antigenitásának vizsgálatára is készítettek monoklonális panelt. A nagyvirulenciájú törzsek esetében - keresztneutralizációs vizsgálatokkal - a klasszikus virulens törzsekhez képest jelentős szerológiai különbséget nem sikerült kimutatni, viszont monoklonális ellenanyagok segítségével olyan epitóp módosulást igen, ami minden vv IBDV törzsben megtalálható, és amit a VP2 fehérjének a 222. aminosavában bekövetkezett mutáció eredményez. Feltételezték, hogy ez az antigenitásbeli különbség is szerepet játszhat abban, hogy a nagyvirulenciájú törzsek képesek áttörni a klasszikus virulens vírusok által kialakított passzív védelmet (Etteradossi és mtsi, 1997).

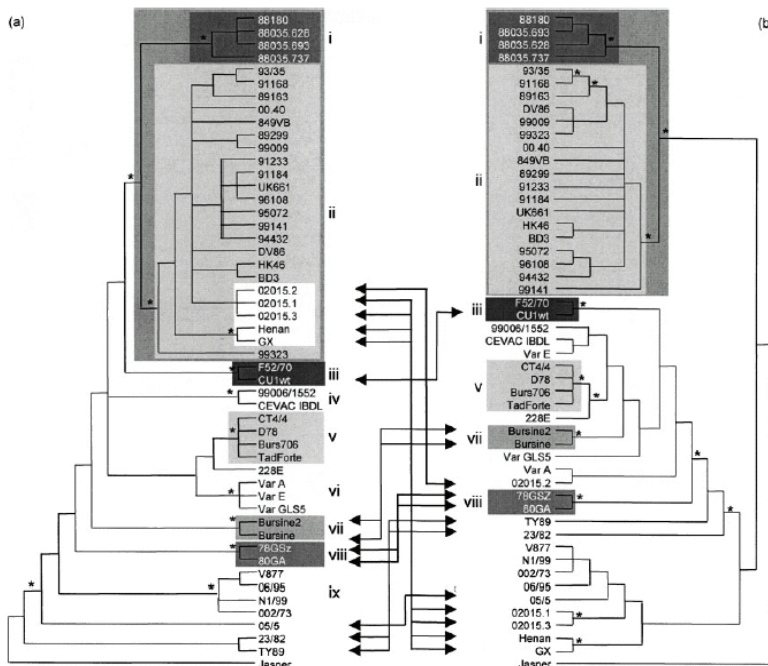
1.3.2 Genetikai alapokon nyugvó törzscsoportosítás-restrikciós enzimek alkalmazásával

A VP2 struktúrfehérje hipervariábilis részét kódoló génszakasz különösen alkalmas az egyes IBDV törzsek (főleg vakcinák) azonosítására, a klasszikus virulenciájú- és vakcina törzsek, az antigén variáns és az úgynevezett nagyvirulenciájú törzsek filogenetikai viszonyának feltárására; továbbá - immunológiai jelentőségénél fogva - a vírustörzsek genetikai megváltozása és az antigenitás változás közötti összefüggés vizsgálatára. A molekuláris módszerek elterjedésével megjelentek az erre a génszakaszra épülő gyors, a mezei izolátumok (azaz a baromfiállományokban jelenlévő törzsek) csoportosítására alkalmas módszerek. Ezekben a módszerekben a vírusok nukleinsavát kitisztítják, cDNS-sé átírják, majd PCR-rel specifikus primerek segítségével a hipervariábilis régiót kódoló génszakaszt felszaporítják. Az így nyert PCR terméket különböző restriktív endonukleázokkal megemésztik és agaróz-

gelen megfuttatják. A restriktációs enzimek vágáshelyeinek megléte, vagy hiánya alapján sorolják a vírusokat csoportokba. Kezdetben csak néhány törzs VP2 szekvenciája volt elérhető, ezek alapján *Jackwood és Jackwood (1994)* hat különböző restriktációs enzimet választott ki, amelyek emésztési képe lehetővé tette a törzsek csoportokba sorolását és a klasszikus virulens, valamint a variáns törzsek elkülönítését. Mivel ennél a módszernél az összes vizsgálandó törzset külön-külön, mind a hat restriktációs enzimmal meg kellett emésztetni, ezért nagyszámú törzs párhuzamos vizsgálatára nem volt alkalmas. Ezt a hátrányt kiküszöbölendő, később kétféle elven alapuló módszer terjedt el, amit az egyre több IBDV törzs szekvenciájának ismerete tett lehetővé. Az egyik esetben csak néhány restriktációs enzimet használtak, amelyek csak bizonyos törzsekre jellemző nukleinsavat ismertek fel. Ilyen például a nagyvirulenciájú és klasszikus virulens törzsek elkülönítésére használt *Bsp* MI, ami csak a nagyvirulenciájú törzseket hasítja és a *Sac* I, ami viszont csak a klasszikus virulens törzseket hasítja (*Zierenberg és mtsi, 2001*). A másik esetben olyan enzimeket választottak, melyek gyakori felismerő hellyel rendelkeznek, így a PCR terméket megemésztve a különböző törzscsoportok esetében különböző hosszúságú fragmentumokat kaptak (restriction fragment length polymorphism, RFLP). Az RFLP mintázat alapján a törzseket molekuláris csoportokba sorolták. Eredetileg öt csoportot állítottak fel: az 1-es és a 2-es antigén variáns, 3-as klasszikus virulens, a 4-es sejtenyészethez adaptált vakcina, az 5-ös pedig a „Lukert-szerű” vakcinatörzseket tartalmazta; ezt egészítette ki később a 6-os csoport, amibe az újabban megjelent variáns törzsek kerültek (*Jackwood és Sommer, 1998*). A restriktációs enzimekkel végzett törzstipizálásnak több hátránya is van. Egyrészt csak a vizsgálandó szekvencia néhány nukleotidjának változására érzékenyek (ami a felismerő helyükben kitüntetett szerepet játszik). Így előfordulhat, hogy egy törzs esetében a vizsgálandó szakaszon történt egyetlen nukleotid mutáció a felismerő helyet tönkréteszi, ezáltal a törzset rossz csoportba sorolják. Erre példa egy kínai IBDV törzs, ami 90% körüli elhullást okoz és a szekvencia-analízis alapján a nagyvirulenciájú törzsek közé tartozik, ugyanakkor a *Bsp* MI felismerő helye hiányzik, így restriktációs emésztéssel a törzs hovatartozását nem lehet egyértelműen eldönteni (*Liu és mtsi, 2002*). Másrészt az RFLP vizsgálat esetén túl sok új hasítási mintázatot észlelhetnek, ami lehetetlenné teszi a vírusok besorolását. Így például a kanadai mezei izolátumok vizsgálata során a már említett 6 csoporton túl még további 14 új hasítási mintázatot észleltek (*Ojic és mtsi, 2007*). A fent említett problémák miatt ezek a módszerek visszaszorulóban vannak, és fokozatosan átadják helyüket a hipervariábilis régió szekvenciájának filogenetikai elemzésén alapuló törzscsoportosításnak.

1.3.3 Genetikai alapokon nyugvó törzscsoportosítás-szekvencia-analízis alapján

Az IBD vírus törzsek mind az „A”, mind pedig a „B” szegmens nukleotid szekvenciája alapján monofiletikus csoportokba sorolódnak (8. ábra)



8. ábra Különböző patogenitású IBDV törzsek filogenetikai viszonyai a.) „A” szegmens nukleotid szekvenciája alapján, b.) „B” szegmens nukleotid szekvenciája alapján.

A filogenetikai csoportok jelölései: i.) afrikai nagyvirulenciájú törzsek, ii.) európai és ázsiai nagyvirulenciájú törzsek, iii.) európai klasszikus virulens törzsek, iv.) amerikai klasszikus virulens és belőlük készült vakcinatörzsek I. csoport, v.) sejttenyésztéshoz adaptált vakcinák, vi.) amerikai variáns törzsek, vii.) amerikai klasszikus virulens és belőlük készült vakcina törzsek II. csoport, viii.) európai szubklinikai törzsek, ix.) ausztrál klasszikus virulens és variáns törzsek. 23/82 és TY89 II szerotípusú törzsek. Jasper lazac birnavírus törzs mint „out group”. A nyílak a csoportok vagy törzsek filogenetikai kapcsolatainak áthelyeződését mutatják a két szegmens esetében. A csillag a 80% nál nagyobb „bootstrap” értéket jelöli.

Le Nouën és mtsi, 2006

A nagyvirulenciájú IBDV törzsek VP2 génjében („A” szegmens) található hipervariábilis régió nukleotid szekvenciája alapján, az összes nagyvirulenciájú törzs egymással szoros rokonságban áll, a többi IBDV törzstől különálló csoportot alkotnak, és az európai klasszikus

virulens törzsekkel mutatnak közelebbi rokonságot. A csoporton belül két alcsoport különül el, az egyikbe az európai és ázsiai nagyvirulenciájú izolátumok tartoznak (*Brown és mtsi, 1994*), a másikban pedig a 80-as évek elején Afrikában izolált törzsek találhatók (*Eterradossi és msi, 1999*). Ez utóbbi csoport képviselői mára már teljesen eltűntek, kiszorították őket európai és ázsiai társaik. A nagyvirulenciájú törzsek VP1 szekvenciájának vizsgálata („B” szegmens) is megerősítette, hogy az összes vvIBD vírustörzs a többi I-es és II szerotípusú törzstől teljesen elkülönülő csoportot alkot (*Islam és mtsi, 2001*). Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a nagyvirulenciájú törzsek egyetlen közös ősrre vezethetők vissza, és a két alcsoportjuk ebből, egymástól függetlenül fejlődött tovább. A közös ősr valószínűleg egy európai klasszikus virulens törzs és egy eddig ismeretlen IBDV törzs közötti reasszortáció eredményeképpen jöhetett létre. Az ismeretlen törzs származhatott vadonélő madaraktól, amelyekben az IBD vírus megtalálható, de klinikai megbetegedést nem okoz (*Wang és mtsi, 2007*).

A klasszikus virulens törzsek az „A” szegmens VP2 hipervariábilis régiójának nukleotid szekvenciája alapján három csoportra bonthatók: (i) európai klasszikus virulens törzsek, (ii) amerikai klasszikus virulens törzsek I. és (iii) amerikai klasszikus virulens törzsek II. csoportja. Az „A” szegmens nukleotid szekvenciájából készített filogenetikai fa alapján az európai klasszikus virulens törzsek a nagyvirulenciájú törzsekkel és az amerikai klasszikus virulens törzsek I. csoportjával mutatnak közelebbi rokonságot. Az amerikai klasszikus virulens törzsek I. csoportjába az STC referens virulens törzs és a W2512 (az ábrán CEVAC IBDL) vakcinatörzs tartozik. Ezek a törzsek az amerikai variáns és a sejt kultúra-adaptált törzsekkel mutatnak szoros rokonságot. Az amerikai klasszikus virulens II. csoportba tartozó törzsek (ide tartozik a Lukert és a Bursine2 vakcinatörzs is) a többi IBDV törzscsoporttól elkülönült csoportot alkotnak, jelentősen különböznek minden klasszikus virulens és variáns amerikai törzstől. A „B” szegmens alapján, az európai klasszikus virulens törzsek a nagyvirulenciájú törzsektől jelentősen különböző, önálló csoportot képeznek, ami közelebbi rokonságot az amerikai klasszikus virulens törzsek csoportjaival és az amerikai variáns törzsekkel mutat. Az amerikai I. és II. csoportbeli klasszikus virulens törzsek egymással, az amerikai variáns törzsekkel, valamint a sejt kultúra-adaptált törzsekkel mutatnak szoros rokonságot. A „B” szegmens szekvencia analízise alapján valószínűnek tűnik, hogy minden klasszikus virulens törzs egyetlen közös őstől eredt, míg az „A” szegmens alapján valószínű, hogy később a különböző csoportok egymástól függetlenül fejlődtek tovább.

A klasszikus virulens törzsekből nem-limfoid sejtenvészethez adaptált, attenuált vakcinatörzsek az „A” szegmens szekvenciája alapján a klasszikus virulens törzsektől

különálló, a variáns törzsekhez közelebbi rokonságot mutató csoportot képeznek, míg „B” szegmensük alapján a többi amerikai, klasszikus virulens és variáns törzsszel alkotnak egy csoportot.

Az amerikai variáns törzsek mind az „A” mind a „B” szegmens alapján az amerikai klasszikus virulens törzsekből alakultak ki. Mivel azonban a „B” szegmense több variáns törzsnél is különbözik egymástól, ez többszöri, egymástól függetlenül bekövetkező kialakulásukat valószínűsíti.

Az ausztrál klasszikus virulens- és variáns törzsek mind az „A” mind pedig a „B” szegmensen jelentősen különböznek a többi IBDV törzstől, amit e törzsek a többiekől független kialakulása és fejlődése magyarázhat.

Összességében a vírus két genomszegmensének szekvenciavizsgálata alapján elmondható, hogy a főbb filogenetikai csoportok mind a két, az „A” és a „B” szegmens nukleotid szekvenciája alapján készült fákban egyaránt megtalálhatók, ami a két szegmens ko-evolúcióját igazolja (*Le Nouën és mtsi 2006*).

A vizsgálatok szerint az IBD vírusok közötti reasszortálódás meglehetősen ritka, ezt a genomszegmensnek ko-evolúciója is igazolja. Ennek az alacsony reasszortációs képességnek a molekuláris biológiai háttere ma még ismeretlen, valószínűleg szerepet játszhat benne a szegmens-inkompatibilitás; azaz például az egyik törzs „A” szegmense által kódolt VP3 fehérje nem, vagy csak nagyon gyengén tud kötődni a másik törzs „B” szegmense által kódolt polimerázal, így a kapszid felépülése sikertelen lesz (*Le Nouën és mtsi 2006*).

1.4 A virulencia molekuláris biológiai alapjai

1.4.1 Nem-limfoid sejtenyészethez való adaptálódás

A virulencia molekuláris biológiai hátterének megismeréséhez kezdetben a nem-limfoid sejtenyészethez adaptálás során attenuált törzseket hasonlítottak össze a vírusok eredeti, virulens változataival különböző fehérjéik (a nagy szekvencia variabilitása miatt főleg a VP2) aminosav szekvenciája alapján. *Yamaguchi* és munkatársai (1996) két japán nagyvirulenciájú törzset (OKYM, TKSM) attenuáltak sejtenyészethez-adaptálással. Ezeknek a törzseknek a teljes poliprotein (VP2VP4VP3) szekvenciáját összehasonlították a virulens vad változatokéval. Öt-öt olyan nukleotid eltérést találtak, ami aminosav változáshoz is vezetett, ezekből négy a VP2 hipervariábilis régiójára, míg egy a VP3 fehérjére esett. A VP3-on bekövetkezett változás a két törzsnél más-más aminosavat érintett. A VP2-re eső aminosav változások közül - összehasonlítva más ismert virulens és attenuált IBD vírusok

szekvenciájával is- két változást találtak, ami mind az általuk attenuált két törzsben, mind a többi attenuált törzsben közös volt: a 279. aszparaginsav→aszparagin és a 284. alanin→treonin. Az egyik általuk attenuált vírusnál (TKSM) megfigyeltek még egy aminosav változást, ami a másik törzset (OKYM) kivéve az összes nem-limfoid sejtenyészethez adaptált vakcinatörzsrre jellemző volt: a 253. glutamin→hisztidin. *Liu és Vakharja (2004)* egy amerikai variáns törzset (GLS) adaptáltak sejtenyészethez és vizsgálták az adaptálódás során megváltozott aminosavakat. Az „A” szegmensben csak a VP2 fehérje 253. és 284. aminosavában tapasztaltak változást, ami az előzőekhez hasonlóan 253. glutamin→hisztidin és 284. alanin→treonin volt. A „B” szegmensben is találtak két aminosav változást: a 87. glicin→arginin és a 261. prolin→leucin pozícióban, de ezeknek a változásoknak a szerepe a sejtenyészethez adaptálódásban egyelőre nem ismert.

A reverzgenetikai módszerek bevezetésével, lehetővé vált a nehéz, időigényes és sokszor sikertelen *in vitro* attenuálási folyamatot helyspecifikus (site-directed) mutagenézissel kiváltani és csak egyes aminosavakat megváltoztatva vizsgálni azoknak a vírus szaporodására és virulenciájára gyakorolt hatását. *Mundt (1999)* két vad típusú amerikai variáns vírus (Delaware E és GLS) sejt kultúrához adaptálódását vizsgálta helyspecifikus mutagenézissel. A Delaware E vírus esetében két aminosav változtatásra volt szükség az adaptálódáshoz a VP2 hipervariábilis régiójában: 253. glutamin→hisztidin és 284. alanin→treonin. Érdekes módon a GLS törzs esetében elegendő volt egyetlen, 284. alanin→treonin változtatás is. Az előző két vizsgálatot megfordítva, egy sejt kultúra-adaptált vakcina törzs (D78) a 253. hisztidint→glutaminre, vagy a 284. treonint→alaninra változtatva elvesztette a sejt kultúrában való szaporodás képességét. Ez a vizsgálat -a GLS törzs esetében kapott eredményt némileg cáfolva- azt erősíti meg, hogy mind a két aminosav változás szükséges a sejt kultúra-adaptálódáshoz. *Mundt* megfigyelése szerint a variáns vírusok esetében nem volt szükség a sejt kultúra-adaptálódáshoz a japán kutatók (*Yamaguchi és munkatársai, 1996*) által leírt 279. aszparaginsav→aszparagin módosulásra. *Mundt* azt is vizsgálta, hogy a szerin-gazdag heptapeptidben bekövetkező aminosav változás okozhat-e adaptálódást a sejt kultúrához. Eredményei szerint nem, de nem zárta ki annak lehetőségét, hogy a virulencia befolyásolásában lehet szerepe. *Lim és munkatársai (1999)* szintén helyspecifikus mutagenézissel vizsgálták egy nagyvirulenciájú törzs sejt kultúrához való adaptálódását. Azt találták, hogy a sejt kultúra-adaptálódáshoz két aminosav változásra volt szükség a VP2 hipervariábilis régióján: a 279. aszparaginsav→aszparagin és a 284. alanin→treonin. Ezek a változások megegyeznek a japán kutatók által leírt változásokkal. *Lim és munkatársai Mundt*hoz hasonlóan vizsgálták a szerin-gazdag heptapeptid szerepét is. Az eredményük

meggyezett a *Mundt* által megállapítottal, azaz ennek a régióknak nincs kimutatható szerepe az adaptálódásban. *Van Loon* és munkatársai (2002) szintén egy nagyvirulenciájú törzs (UK661) sejt kultúrához adaptálódását vizsgálták. Három aminosav kombinációt találtak, ami lehetővé teszi a nagyvirulenciájú törzs nem-limfoid sejtenyészetben való szaporodását: 279. aszparagin és a 284. treonin, vagy 253. hisztidin és 284. treonin, valamint csak 284. treonin. A mutánsok sejtenyészetben való szaporodási képességét vizsgálva azt találták, hogy a 253. és 284. pozícióban hisztidin és treonin aminosav változatokat tartalmazó mutáns nagy titerben képes szaporodni, míg a másik két változat csak nagyon alacsony titerben. Ez az eredmény ellentmond a *Lim* és munkatársai által közölt eredményeknek, ahol a 279. aszparagint és 284. treonint tartalmazó mutáns törzs nem-limfoid sejtekben magasabb titerben volt képes szaporodni, mint a szintén sejt kultúra-adaptált D78 vakcinavírus. Vizsgálták még, hogy a 279. aszparaginsav → aszparagin, vagy a 253. glutamin → hisztidin átalakulás elegendő-e valamilyen szintű sejt kultúra-adaptálódáshoz, de az eredmények azt mutatták, hogy e két aminosav változás önmagában nem elégséges a nem-limfoid sejt kultúrában való vírus szaporodáshoz.

Kevesebb vizsgálati eredmény született a „B” szegmens szerepével kapcsolatban. *Brandt* és munkatársai (2001) a D78 törzs (sejtenyészetbe adaptált) teljes „B” szegmensét cserélték le klasszikus virulens törzsére (IM törzs). Az így kapott reassortáns, elveszítette a VERO sejtvonalon (permanens majomvese-sejtvonal) való szaporodási képességét. *Boot* és munkatársai (2000) egy nagyvirulenciájú és egy sejt kultúra-adaptált klasszikus virulens IBDV törzs reassortánsait vizsgálták. A nagyvirulenciájú vírus „B” szegmensét tartalmazó, reassortáns sejt kultúra-adaptált vírus három nagyságrenddel rosszabbul szaporodott sejtenyészetben, mint a szülővírusa. *Liu és Vakharia* (2004) szintén mesterséges reassortánsok szaporodási képességét vizsgálta limfoid sejtekben *in vivo* és nem-limfoid sejtenyészetben. Kiindulási vírusnak egy amerikai variáns IBDV törzs (GLS) többszörös passzázzal sejtenyészetbe adaptált változatát és vad típusát használták. A sejt kultúra-adaptált vírus „A” szegmensét és a vad típus „B” szegmensét tartalmazó reassortáns vírus nem-limfoid sejt kultúrában az adaptálódott vírusnál lassabban szaporodott, ellenben limfoid sejtekben (*in vivo*) jobban. Megpróbálták ennek a reassortánsnak a fordítottját elkészíteni embrionált tyúktojáson, de a reassortáns - feltehetően a variáns törzsek embrionált tyúktojásban tapasztalható gyenge szaporodási képessége miatt - nem sikerült izolálni. Fluoreszcens festéssel azonban megállapították, hogy a vírus nukleinsav képes volt a transzfektált sejtekben amplifikálódni, de a kész reassortáns vírus nem volt képes újabb sejteket megfertőzni. A vad vírusból származó nukleinsavval is transzfektáltak sejtenyészetet,

melynek vizsgálata során -a reasszortánshoz hasonlóan- a fertőződés sejtről-sejtre terjedése hiányzott a vírus felszaporodásához. Ezek a vizsgálatok megerősítik azt a nézetet, hogy a vírus sejtropizmusáért (bejutás a célsejtbe) a VP2, míg a különböző sejteken belüli szaporodásáért (fertőzőképes virionok kialakulása) a VP1 a felelős.

Összefoglalva az „A” szegmens sejtenyészethez való adaptálódásban betöltött szerepére vonatkozó eredményeket:

- a VP2 látszik a legjelentősebbnek, azon belül pedig:
 - a 253. pozícióban levő hisztidin (növeli az elérhető vírustitert),
 - a 279. pozícióban levő aszparagin (jelentősége kérdéses, valószínűleg segíti az intenzív vírusszaporodást, de hiányában is képes lehet adaptálódni a vírus)
 - és a 284. pozícióban treonin jelentősége kiemelt (ez teszi lehetővé, hogy nem-limfoid sejtekbe bejusson a vírus), míg
 - a szerin-gazdag heptapeptid megváltozása nincs hatással az adaptálódásra;
- a VP3, illetve VP4 génekben nem találtak az adaptálódással összefüggésbe hozható változásokat.

A „B” szegmens által kódolt VP1 szerepe meghatározó abban, hogy:

- a vírus képes-e a gazdafajtól eltérő sejtekben szaporodni (pl. VERO), illetve
- képes-e a vírus nukleinsavból fertőzőképes virion képződni.

1.4.2 Virulencia

Az eddig bemutatott vizsgálatokban elsősorban a sejt kultúra-adaptáltság molekuláris hátterét vizsgálták, amelyet csak néhány esetben egészítettek ki patogenitásra vonatkozó eredményekkel. *Brandt* és munkatársai (2001) D78 sejt kultúrához adaptált vakcinatörzs és az Irwin Moulthrop (IM) klasszikus virulens törzs segítségével készítettek különböző mesterséges reasszortánsokat. Amikor a D78 törzs VP2 génjét lecserélték az IM törzs VP2 génjére, a reasszortáns törzs virulenciája a D78 vakcina törzshöz képest jelentősen megemelkedett és megegyezett az IM klasszikus virulens törzsével. Azaz az IM törzs esetében a virulenciát egyértelműen a VP2 határozta meg. Amennyiben a VP4VP3 géneket cserélték le a vakcina törzsben a klasszikus virulens törzsére, azt találták, hogy a reasszortáns vírus a D78 szülő törzshöz képest súlyosabb kórbonctani és kórszövettani elváltozásokat okoz a bursában, de klinikai tüneteket a fertőzött csirkékben nem vált ki. Ez az eredmény rámutat arra, hogy a VP4 és VP3 fehérjék korlátozottan, de szintén részt vesznek a virulencia kialakításában. *Boot* és munkatársai (2002) nagyvirulenciájú törzs VP3 fehérjéjének C-terminális szakaszát II-es szerotípusú törzsére cserélték és *Brandthoz* és munkatársaihoz

hasonlóan azt találták, hogy az így képződött mutáns törzs patogenitása csirkében szignifikánsan csökkent, de még így is jelentős bursakárosodást okozott. Mivel a VP3 fehérje C-terminálisa a vírusgenomhoz és a polimerázhoz egyaránt kötődve segíti a kapszid összeépülését, így a változás valószínűleg az RNS és/vagy a fehérjekötő képesség befolyásolásán keresztül nehezítette a vírus összeszerelődését, ezáltal csökkentette a virulenciáját. Amikor ennek a mutáns törzsnek a „B” szegmensét lecserélték egy klasszikus virulens sejt kultúra-adaptált törzsére, a törzs virulenciája tovább csökkent és a bursakárosító képessége is jelentősen gyengült (*Boot és mtsi, 2005*). Ez az eredmény rámutat arra, hogy a virulencia kialakításában a vírusreplikáció hatékonyságát befolyásolva a VP1 is jelentős szereppel bír. Ezt támasztja alá egy másik kísérletük, amikor egy sejt kultúra-adaptált klasszikus virulens törzs VP2 génjét cserélték le egy nagyvirulenciájú törzs VP2 génjére. A létrejött mozaikos mutáns vírus bursakárosító hatása jelentősen megnövekedett az eredeti sejt kultúra-adaptált vírushoz képest, de elhullást nem okozott. Ez az eredmény némileg ellentmond *Brandt és munkatársai (2001)* által tapasztaltaknak, ahol az IM törzs virulenciájáért egyértelműen a VP2 fehérje volt felelős. Egy hasonló kísérletben - *Boot és munkatársai (2000)* - több mesterséges reassortáns vírust készítettek egy nagyvirulenciájú és egy sejt kultúra-adaptált klasszikus virulens IBDV törzs között. Ha nagyvirulenciájú vírusnak cserélték le a „B” szegmensét sejt kultúra-adaptált víruséra, az így kapott reassortáns vírus patogenitása nem különbözött lényegesen a nagyvirulenciájú szülővírusétól. Ha megfordítva, a sejt kultúra-adaptált vírus „B” szegmensét nagyvirulenciájúra cserélték, akkor a reassortáns vírus virulenciája nem emelkedett, az megegyezett az „A” szegmenset adó vírus virulenciájával. *Van Loon és munkatársai (2002)* a nagyvirulenciájú UK661 törzsből helyspecifikus mutagenézissel előállított 253. hisztidin és 284. treonin mutáns vírus patogenitását vizsgálták csirkében, ahol - a vad típusú vírussal ellentétben - sem elhullást, sem pedig jelentős bursakárosodást nem okozott. Ez a vizsgálat eredménye rávilágít arra, amit az élővírust tartalmazó vakcinák fejlesztése során már régóta kihasználnak, nevezetesen a nem-limfoid sejt kultúrához való adaptálás minden esetben a vírus attenuálódását vonja maga után. A természetben ritkán előforduló reassortánsok vizsgálata vegyes eredményt hozott a két szegmensnek a virulencia kialakításában játszott szerepéről. A GX törzset 1996-ban izolálták Kínában. Az elhullási adatokból és a patogenitási vizsgálat alapján nagyvirulenciájú törzsnek sorolták be. A VP2 szekvencia-analízise is megerősítette a nagyvirulenciájú törzsekkel való rokonságát, a VP1 szekvencia-analízise alapján viszont a törzs az ausztrál klasszikus virulens törzshöz (002-73) mutatott közelebbi rokonságot (*Gao és mtsi, 2007*). Ezzel szemben egy 2002-ben Venezuelában izolált törzs (02015.1) VP2 szekvenciája szintén a nagyvirulenciájú

törzsekkel mutatott szoros rokonságot és a VP1 szekvenciája a GX törzshöz hasonlóan nem a nagyvirulenciájú törzsekhez, hanem az ausztrál törzsekhez állt közel. A törzssel végzett patogenitási vizsgálatok viszont - a GX törzssel ellentétben - a nagyvirulenciájú törzsekhez képest jelentősen csökkent virulenciát mutattak ki (*Le Nouën és mtsi 2006*). A GX törzsnél tapasztalt eredmény összhangban van a mesterséges reassortánsokon végzett vizsgálatokkal, viszont a venezuelai reassortáns meglepő eredménnyel szolgált és arra utal, hogy esetében más tényezők játszhattak szerepet a virulencia csökkenésében.

Ashraf és munkatársai (2007) egy holland, két török és két tajvani - előzőleg a patogenitási vizsgálatok és az eseteleírások alapján nagyvirulenciájú törzsnek besorolt vírus - teljes VP1 szekvenciáját hasonlították össze más, különböző patogenitású törzsek VP1 szekvenciájával. A holland és a két török izolátum VP1 szekvenciája a nagyvirulenciájú törzsekével mutatott szoros rokonságot, míg a két tajvani törzs VP1 szekvenciája a klasszikus virulens törzsekhez állt közel. Ezen adatok alapján a szerzők megállapították, hogy a szekvencia-analízis és az IBD vírust kimutató molekuláris módszerek alkalmasak a törzsek közötti hasonlóságok illetve különbségek kimutatására valamint a köztük lévő genetikai rokonság megállapítására, de a törzsek patogenitásának meghatározásában az *in vivo* vizsgálatok elengedhetetlenek.

Összefoglalva a leírtakat: a vírus fehérjéinek virulencia kialakításában betöltött szerepéről egymásnak ellentmondó eredmények születtek. Egyes kísérletekben csak a VP2, míg másokban a VP2 mellett a VP1 is jelentősen befolyásolta a virulencia szintjét. Biztosnak látszik viszont, hogy a nem-limfoid sejtekhez adaptálódásért felelős, a 253., 279. és 284. pozícióban található aminosavak szintén befolyásolhatják a patogenitást. Ezen kívül a VP3 is -kis mértékben ugyan-, de befolyásolhatja a virulencia megváltozását. Ezek a vizsgálatok alapján nem lehet pontosan megállapítani, hogy mi a virulencia-változások genetikai háttere, kialakulását valószínűleg több tényező befolyásolja.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám célja az alábbiak szerint foglalható össze:

- 1) IBDV vírusok esetében alkalmazható molekuláris diagnosztikai módszer kidolgozása:
 - a) az IBD vírus szervmintákból való kimutatására alkalmas, a VP2 gén variábilis szakaszát amplifikáló RT-PCR rendszer kidolgozása,
 - b) a PCR termék további analízisen alapuló diagnosztikai módszer kidolgozása a különböző patotípusú IBD vírusok (vakcinák és virulens törzsek, továbbá utóbbiakon belül klasszikus, nagyvirulenciájú és variáns csoportok) megbízható elkülönítésére.
- 2) Gumboro vírusok genetikai sokféleségének vizsgálata:
 - a) IBD vírusok különböző csoportjainak genetikai jellemzése (különös hangsúlyt fektetve a magyarországi izolátumok vizsgálatára, valamint a VP2 hipervariábilis régiójára koncentrálni),
 - b) filogenetikai kapcsolataik feltárása,
 - c) különböző patogenitású törzsek összehasonlításán keresztül a patogenitás molekuláris hátterének vizsgálata (ennek részeként reprezentatív vírustörzsek patogenitásának ellenőrzése *in vivo*),
 - d) nem-limfoid sejtenyészetekhez adaptált és csak limfoid sejtekben szaporodni képes vakcinavírusok összehasonlítása alapján, az adaptálódás genetikai hátterének vizsgálata.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Vírus RNS tisztítás és reverztranszkripció

A virális RNS-t közvetlenül szervhomogenizátumból vagy liofilizált vakcinák esetén az eredeti töltési térfogatra steril PBS-sel (foszfát-pufferrel pufferolt fiziológiás sóoldat) feloldott vakcinából végezzük. 200 µl szervhomogenizátumhoz vagy vakcinához 50 µl 5x töménységű puffert (SDS, EDTA) és 2,5 µl Proteináz K (20 mg/ml) enzimet adunk és 55°C-on 1 órán keresztül inkubáljuk. Az így kapott 250 µl mintához 750 µl TRI reagens LS (Sigma)-t adunk, felfuszpendáljuk és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezután az elegyhez 200 µl kloroformot adunk, jól elkeverjük és 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Az inkubáció lejárta után 12000 rpm fordulaton, 4°C-on 15 percig centrifugáljuk, majd a vizes fázist egy tiszta csőbe átmérjük úgy, hogy a szerves fázisból ne kerüljön bele semmi. A vizes fázishoz 500 µl izopropanolt mérünk, jól elkeverjük és hagyjuk 15 percig szobahőmérsékleten kicsapódni az RNS-t. A kicsapódott RNS-t 12000 rpm fordulaton, 4°C-on 15 percig centrifugáljuk, majd az RNS csapadékról a felülúszót leöntjük. Az RNS csapadékot 1 ml 75 %-os etanollal mossuk, 12000 rpm fordulaton, 4°C-on 10 percig centrifugáljuk, majd az összes alkoholt leszívjuk az RNS csapadékról. A csapadékot szárítjuk, majd 25 µl DEPC-cel (dietyl-pirokarbonát) kezelt Milli Q tisztaságú vízben feloldjuk. Az így kapott RNS oldatot a duplaszálú RNS szétválasztásához 95°C-on 5 percig inkubáljuk, majd -20°C-on gyorsan lehűtjük. -70°C-on tároljuk felhasználásig, de maximum 2 hónapig.

A reverz-transzkripcióhoz (RT) 5 µl az előbbieket szerint előkészített RNS oldatot használunk. A 25 µl végtérfogatba 5 µl 5x töménységű RT-puffert, 4 µl dNTP keveréket (2,5 mM, Fermentas), 1 µl random hexamer primert (50 µg/ml), 1 µl Ribolock RNáz inhibitor (40 U/µl, Fermentas), 1 µl M-MLV reverz transzkriptáz enzimet (200U, Promega) és 8 µl DEPC-cel kezelt Milli Q tisztaságú vizet adunk. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 10 percig állni hagyjuk, majd 37°C-on 1,5 órán keresztül inkubáljuk és az inkubációs idő letelte után 5 percig 95°C-on tartjuk. Az így kapott cDNS-t felhasználásig -20°C-on tároljuk.

3.2 Nested PCR reakció

A külső PCR reakciót a Liu és munkatársai (1994) által leírt P1: 5'-TCACCGTCCTCAGCTTAC-3', és P2: 5'-TCAGGATTTGGGATCAGC-3' primerekkel végezzük, ami egy 643 bázis pár (bp) hosszú PCR terméket eredményez. A külső PCR reakcióhoz 50 µl végtérfogatra, 31 µl steril Milli Q tisztaságú vizet, 5 µl 10x PCR-puffert,

5 µl MgCl₂-ot (25 mM), 0,5 µl BSA-t (borjú szérum albumin, 10 mg/ml), 1,5 µl dNTP keveréket (2,5 mM, Fermentas), 1-1 µl P1-P2 primert (10 µM), 0,4 µl Taq polimerázt (5 U/µl, Fermentas) és 5 µl cDNS-t adunk templátként. A PCR-hez használt program a következő: elődenaturáció 95°C 4 perc; majd 30 ciklus 94°C 1 perc, 60°C 2 perc és végül utóelongáció 60°C 10 perc. Az így kapott PCR elegyből 5 µl-t 1 µl 6x futtató-pufferrel (Fermentas) kiegészítve TBE (TRIS, borát és EDTA) pufferben, 1,5% agaróz gélen megfuttatjuk. A PCR elegyből további 10 µl-t steril Milli Q tisztaságú vízben 50-szeresre hígítunk és ezt használjuk a belső PCR-ben templátként. A külső PCR negatív kontrollját is meghígítjuk és a vizsgálandó mintákkal együtt, a belső PCR-ben felszorítjuk a belső PCR saját negatív kontrollja mellett. A belső PCR reakciót a *Lin* és munkatársai (1993) által leírt 2.3: 5-CCCAGAGTCTACACCATA-3' és 5.3: 5'-TCCTGTTGCCACTCTTTC-3' primerpárral végezzük amelyek egy 474 bp hosszú PCR terméket eredményeznek. A belső PCR reakcióhoz 50 µl végtérfogatra: 34 µl steril Milli Q tisztaságú vizet, 5 µl 10x PCR-puffert, 3 µl MgCl₂-ot (25 mM), 0,5 µl BSA-t (borjú szérum albumin, 10 mg/ml), 1,5 µl dNTP keveréket (2,5 mM, Fermentas), 0,75-0,75 µl 2.3-5.3 primert (10 µM), 0,4 µl Taq polimerázt (5 U/µl, Fermentas) és 5 µl 50x hígított P1-P2 PCR terméket adunk. A PCR program a következő: elődenaturáció 95°C 4 perc, majd 25 ciklus 94°C 1 perc, 52°C 1 perc, 72°C 1 perc és végül 72°C 10 perc utóelongáció. Az így nyert PCR elegyből 5 µl-t 1 µl 6x futtató-pufferrel (Fermentas) kiegészítve TBE pufferben, 1,5% agaróz gélen, 80V feszültséggel 40 perc alatt megfuttatjuk. A PCR termék futtatásokhoz hosszúság markerként 100 bp-as DNS létrát (Fermentas) használunk. A gélt etídium-bromid oldattal (0,5 µg/ml) festjük és gél dokumentációs rendszerrel (Gel Dock 2000, Bio-Rad) lefényképezzük.

3.3 RFLP analízis

A PCR termék restrikciós enzim eszétését 10 µl végtérfogatban végezzük, amibe 3,5 µl Milli Q minőségű steril vizet, 1 µl 10x restrikciós enzim puffert (a gyártó által az enzimhez mellékelte) és 0,5 µl restrikciós enzimet (10 U/µl), valamint 5 µl tisztított 2.3-5.3 PCR terméket mérünk. Az elegyet a restrikciós enzim számára optimális hőmérsékleten (*Bse* DI 55°C; *Bsp* MI, *Ssp* I és *Eco* 911 37°C) egy órán keresztül eszétjük. A reakcióelegyet 2 µl 6x futtató-pufferrel (Fermentas) kiegészítve TBE pufferben, 2,5% MetaPhor agaróz (Loza) gélen, 80V feszültséggel, 1,5 óra alatt megfuttatjuk. Hosszúság markerként 50 bp-as DNS létrát (Fermentas) használunk. A gélt etídium-bromid oldattal (0,5 µg/ml) festjük és gél dokumentációs rendszerrel (Gel Dock, Bio-Rad) lefényképezzük.

3.4 Szekvencia analízis

A PCR terméket QIAquick PCR tisztító kittel (QIAGEN) megtisztítjuk és a tisztítás eredményét 1,5%-os agaróz gélen ellenőrizzük. A terméket szekvenálás céljából a BIOMI kft (Gödöllő) szekvenáló laborjába küldjük, akik a PCR termék mind a két szálát megszekvenálják a belső PCR-hez használt primerek segítségével és a szekvenálás eredményét kromatogrammok formájában elküldik. Az egy törzshöz tartozó két kromatogrammot egymással összehasonlítjuk és az esetleges szekvenálási hibákat kijavítjuk, bizonytalan esetekben a szekvenálás megismételtetjük. A szekvenciákról a másik primer szekvenciáját levágjuk. A szekvenciák illesztését más a GenBank-ból vagy saját, előző vizsgálatokból származó szekvenciákkal a „BioEdit sequence alignment editor” program segítségével ClustalW illesztési módszerrel végezzük. Az illesztett szekvenciák közti hasonlóságokat a „TREECON for Windows” program (van de Peer és mtsi, 1994) segítségével Kimura 2 paraméteres módszerével számoljuk ki és a filogenetikai fát a Neighbour-joining módszerrel szerkesztjük meg.

3.5 Mezei vírusok izolálása csirkében

Vírusonként öt, 3-6 hetes kor közötti, specifikus kórokozótól mentes (SPF) csirkét fertőzünk szájon keresztül (*per os*) 200 µl, a mezei vírust tartalmazó szervhomogenizátummal (általában legalább 10 m/m%-os bursa homogenizátum). Az állatokat izolált körülmények között tartjuk, steril takarmánnyal etetjük és három-négy napon keresztül naponta megfigyeljük őket. A fertőzést követő harmadik vagy negyedik napon az állatokat elvéreztetjük és a bursájukat (*bursa Fabricii*) steril olló és anatómiai csipesz segítségével eltávolítjuk. Az eltávolított bursákat félbevágjuk: az egyik felet 10%-os formalin oldatban fixáljuk szövettani vizsgálathoz, a másik felet az összes állatból egységesen elhomogenizáljuk steril, antibiotikummal (gentamicin-szulfát, kolisztin-szulfát és norfloxacin) kiegészített PBS oldattal úgy, hogy 10 m/m%-os homogenizátumot kapjunk. A homogenizátumot 1,5 ml-enként fagyasztó csövekbe osztjuk és -70°C-on tároljuk.

3.6 Mezei vírusok izolálása embrionált tojásban

Vírusonként öt, 11 napos embrionált SPF tojás légzsákját áthelyezzük úgy, hogy a *chorio-allantois*-membrán (CAM) hozzáférhető legyen. A mezei vírust tartalmazó szervhomogenizátumot 0,45 µm pórusátmérőjű szűrővel megsűrjük és tojásonként 200 µl-t a CAM-ra oltunk. A tojásokat 7 napig 37°C-on inkubáljuk, naponta meglámpázzuk őket és a harmadik napot követően elhullott tojásokat 4°C-on gyűjtjük. A nyolcadik napon a még

megmaradt tojásokat kihűtőzzük és a 4°C-on tartott tojásokkal együtt feldolgozzuk (lehetőség szerint a már elhullott embriókat 1-2 napon belül feldolgozzuk és a vizsgálat végén egyesítjük a különböző napokon nyert víruszuspenziókat). A tojások *allantois*-folyadékát egyesével leszívjuk, majd az embriókat tünet alapján bíráljuk (kipirult bőr, ödémás test, fej; májon elhalásos göcök, vagy gyulladt, merev májlebenyek, epefestéktől zöldes elszíneződéssel; esetleg duzzadt lép). A fejlődésben visszamaradt, kipirult embriók belső szerveit az előzőleg ugyanabból a tojásból leszívott *allantois*-folyadékkal együtt elhomogenizáljuk, úgy hogy körülbelül 10 m/m%-os homogenizátumot kapjunk. Az azonos vírussal beoltott embrió-homogenizátumokat egyesítjük és 1,5 ml-es fagyasztó csövekbe szétosztva -70°C-on tároljuk.

3.7 Vakcinavírusok felszaporítása primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészetben

SPF embrionált tyúktojásból (9-10 napos) primer csirkeembrió-fibroblaszt (chicken embryo fibroblast, CEF) sejtenyészetet készítünk (*Schat és Purchase, 1998*). A felszaporítást/vizsgálatot 25cm² felszínű szövetenyésztő-palackon végezzük. Palackonként 150.000 sejt/cm² CEF-et mérünk be; amit 8 v/v% kolosztum-mentes borjúsavóval kiegészített tápfolyadékkal (Hanks' minimal essential medium, MEM-H) 10 ml-re kiegészítünk. Az így előkészített palackokat 200 µl víruszuspenzióval fertőzzük, egy palackot szövetkontrollként hagyunk. A palackokat 37°C-os termosztátban inkubáljuk legfeljebb 7 napon keresztül, mialatt naponta mikroszkópos vizsgálatot végzünk a vírusra jellemző sejtkárosító hatás kimutatására (az IBDV a fertőzött sejtek lekerekedését, valamint a palack felületéről való leválását, ezáltal a monolayer „felszakadozását” idézi elő). A 70-80%-os citopatogén hatás (CP hatás) elérésekor a palackot -20°C-ra fagyaszttjuk. Felolvasztást követően jégkásás állapotban a még letapadt sejteket a palack felszínéről lerázzuk, majd a víruszuspenziót lecentrifugáljuk (1600×g, 10 perc) és a felülúszót szétosztást követően -70°C-on tároljuk.

3.8 IBD víruszuspenziók titrálása SPF embrionált tojásban

Az IBDV titrálását a mezei vírusok izolálásánál leírt módon előkészített, 9-11 napos embrionált, SPF tyúktojáson végezzük. Ehhez a vizsgálandó víruszuspenzióból PBS-ben 10-es léptékű hígítási sort készítünk. Félkémcsövekbe kimérünk 4,5-4,5 ml PBS-t, majd az első csöbe 0,5 ml tömény víruszuspenziót mérünk. Az így kapott 10-szeres hígítást („-1-es hígítás”) kémcsőkeverővel alaposan homogenizáljuk, majd belőle 0,5 ml-t mérünk a 2. csöbe („-2-es hígítás”). Így haladunk tovább hígítási lépésenként, amíg a titráláshoz szükséges legnagyobb hígítást is elkészítjük. A titráláshoz szükséges hígításokat úgy határozzuk meg, hogy lehetőleg egy teljesen pozitív és egy teljesen negatív hígítási lépés is szerepeljen benne.

Általában 4, legfeljebb 5 hígítási lépést oltunk be tojásba, hígításonként 5-5 tojást oltunk. A beoltott tojásokat 8 napig 37°C-on inkubáljuk, naponta meglámpázzuk. Az inkubálási idő során elhullott, illetve a 8. napon hűtőzött tojásokat egyesével kibontjuk, és az embriókat megvizsgáljuk az IBDV szaporodására utaló tünetekre (kipirult bőr, ödémás test, fej; májon elhalásos göcök, vagy gyulladt, merev májlebenyek, epefestéktől zöldes elszíneződéssel; esetleg duzzadt lép). Titerként azt az elméleti hígítást adjuk meg, amelyet beoltva az embriók 50%-ban tapasztalnánk a vírus szaporodására utaló elváltozásokat (median embryo infective dose, EID₅₀). A titer kiszámítását Spearman-Kärber módszere szerint végezzük (*Villegas, 1998*). A pontosabb titer-meghatározás érdekében 2, vagy 3 hígítási sort készítünk és oltunk ugyanabból a mintából, melyek eredményéből számított átlagot tekintjük a minta titerének; továbbá ugyanabban a vizsgálati rendszerben ismert titerű, belső kontroll IBDV vírusszuspenziót is beállítunk.

3.9 IBD vírusszuspenziók titrálása primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészetben (mikrolemezen végzett vizsgálat)

A titrálást 96-llyukú mikrolemezen, szuszpenzióban végezzük. Ehhez a 96-llyukú szövettenyésztő lemez minden egyes vályulatába 100-100µl, SPF csirkeembrióból készített, primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtszuspenziót (sejtszám 3×10^5 sejt/ml) mérünk. A sejtszuspenziót 15% kolosztummentes borjúsavót tartalmazó tápfolyadékban (Hanks' minimal essential medium, MEM-H) készítjük el. A titrálandó vírusszuspenzióból tízes léptékű tova futó hígítást készítünk MEM-H tápfolyadékban (1,8 ml tápfolyadékhoz 0,2 ml vírusszuspenziót mérve). A titráláshoz szükséges hígítások meghatározása megegyezik az embrionált tojáson végzett titrálásnál leírtakkal. Ismeretlen titerű vírusszuspenziók esetében általában -1-től -8-as hígításig minden hígítási lépést 5-5 vályulatba mérünk (100-100µl-t). A szövetkontrollként hagyott vályulatokba 100-100µl MEM-H tápfolyadékot mérünk. A lemezeket 37°C-on, CO₂-os termosztátban inkubáljuk 6 napon keresztül, majd a vírusra jellemző sejtkárosító hatás (sejtek lekerekedése, leválása a lemez felszínéről) alapján bíráljuk. A vírusszuspenzió titerét (median tissue culture infective dose, TCID₅₀) Spearman-Kärber módszere alapján határozzuk meg (*Villegas, 1998*). A pontosabb titer-meghatározás érdekében 2, vagy 3 hígítási sort készítünk és oltunk ugyanabból a mintából, melyek eredményéből számított átlagot tekintjük a minta titerének; továbbá ugyanabban a vizsgálati rendszerben ismert titerű, belső kontroll IBDV vírusszuspenziót is beállítunk.

3.10 IBD vírusszuspenziók plakktitrálása primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészetben

SPF embrionált tyúktojásból (9-10 napos) primer csirkeembrió-fibroblaszt (CEF) sejtenyészetet készítünk és a sejtenyészet koncentrációját 10% borjúsavót tartalmazó MEM-H tápfolyadékmal beállítjuk 3×10^5 sejt/ml-re. 3,5 cm átmérőjű szövettenyésztésre alkalmas Petri-csészékbe 5-5 ml sejtuszuspenziót mérünk és 37°C-on, CO₂-os termosztátban inkubáljuk őket 24 órán keresztül. A vizsgálandó vírusszuspenzióból 10-es léptékű hígítási sort készítünk 3% borjúsavót tartalmazó MEM-H tápfolyadékban. A Petri-csészékről a tápfolyadékot leszívjuk és a hígítási sorból 100-100 µl-t az összesített sejt kultúrára mérünk. Egy órán keresztül inkubáljuk 37°C-on, CO₂-os termosztátban, úgy hogy 5 percenként a Petri-csészéket óvatosan himbálva segítjük a vírusok egyenletes eloszlását, valamint megakadályozzuk a sejtenyészet felszínének kiszáradását. Az inkubálás végeztével a sejtenyészetet lefedjük 40°C-os vízfürdőben tartott 0,8%-os tápagar-oldattal (3% borjúsavó, MEM-H). A tápagart hagyjuk szobahőmérsékleten megdermedni, majd 3 napon keresztül 37°C-on, CO₂-os termosztátban inkubáljuk a sejtenyészeteket. A plakkok láthatóvá tételéhez a Petri-csészékbe 200 µl 0,03 m/v%-os neutrálvírös-oldatot mérünk és 2 órán keresztül 37°C-on inkubáljuk, majd szobahőmérsékleten további 12 órát állni hagyjuk. Az inkubációs idő elteltével a plakkokat megszámloljuk (a neutrálvírös csak az élő sejteket festi meg) és a vírus mennyiséget PFU/ml (plakkot képező egység, plaque forming unit) mértékegységben adjuk meg.

3.11 IBDV specifikus ellenanyagok szintjének meghatározása vírusneutralizációs teszttel

A vizsgálatot primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészetben, 96-lyukú mikrolemezen, B módszerrel (állandó mennyiségű vírus-változó mennyiségű savó) végezzük. A vérsavókat a vizsgálat előtt 56°C-on 30 percig, vízfürdőben inkubálva inaktíváljuk. A vizsgálandó vérsavókból borjúsavó-mentes tápfolyadékban, 2 párhuzamosban, kettes léptékű tova futó hígítási sort készítünk (50µl savó+50µl MEM-H). A neutralizáló víusból MEM-H tápfolyadékban 100-500 TCID₅₀/50µl titerű hígítást készítünk. Ebből a hígított vírusszuspenzióból 50-50µl-t mérünk minden, hígított savót tartalmazó vályulatba. Ezt követően 1 órán keresztül 37°C-os CO₂-os termosztátban inkubáljuk a lemezeket (neutralizáció). Az inkubációs idő végén 100µl sejtuszuspenziót (3×10^5 sejt/ml sejt számú primer CEF 15% kolosztrummentes borjúsavót tartalmazó MEM-H tápfolyadékban) mérünk minden vályulatba, majd a szövetkontrollként hagyott vályulatokban levő sejtuszuspenziót

100µl MEM-H tápfolyadékkal egészítjük ki. A hígított neutralizáló vírust -a víruszuspenzió titrálása sejtenyészeten részben leírtak szerint, ld. 3.9 pont)- visszatitrljuk. Minden vizsgálatnál legalább 1, ismert titerű savót is beállítunk kontrollként. A bírálatot 5 nap inkubációt (37°C-on, CO₂-os termosztátban) követően, a vírusra jellemző citopatogén hatás jelenléte alapján végezzük. Titerként azt az elméleti hígítást határozzuk meg, amelyben a savó a vizsgált vályulatok 50%-ban képes a vírust teljes mértékben neutralizálni (Spearman-Kärber módszer, *Villegas, 1998.*)

3.12 1977 és 1981 között Magyarországon izolált IBDV törzsek szaporodási képességének vizsgálata nem-limfoid sejtenyészeten

Öt 1977 és 1981 között Magyarországon izolált szubklinikai IBDV törzs (P6/78, P7/78, P9/81, P10/81 és P11/81) szaporodási képességét vizsgáltuk meg CEF sejtenyészeten. A törzseket előzőleg SPF csirkékben felszaporítottuk majd az így nyert víruszuspenzióból vírusról 200µl külön-külön 25cm² felületű szövettenyésző-palackra oltottunk. A palackokat 6 napon keresztül 37°C-on, CO₂-os termosztátban inkubáltuk és naponta ellenőriztük mikroszkóppal a sejtenyészet állapotát (az esetleges citopatogén hatást). Az inkubálást a vírusra jellemző CP hatás egyértelmű kimutatásáig folytattuk, de maximum 6 napig, majd utána a vizsgálatot lezártuk.

3.13 A különböző vakcinacsoportok sejt kultúra-adaptáltságának vizsgálata

Annak eldöntésére, hogy a különböző csoportok vakcinái képesek-e nem-limfoid sejtenyészeten szaporodni csoportonként egy, vagy bizonyos esetekben két vakcinát CEF sejtenyészetre oltottunk. Minden vakcina esetén bontatlan ampullából indultunk ki és vakcinánként 200µl-t külön-külön 25cm² felületű szövettenyésző-palackra oltottunk. A D78-as csoportból a TAD Gumboro Vac (gyártó:Lohmann) és a Poulvac (gyártó:Solway) vakcinákat, a P2 csoportból a TAD Gumboro Vac Forte (gyártó:Lohmann) és az Univax BD (gyártó:Schering-Plough) vakcinákat, a 228E csoportból a Nobilis Gumboro 228E (gyártó: Intervet) vakcinát, az STC csoportból a Bursa-Vac (gyártó:Schering-Plough) vakcinát, a Lukert csoportból a Poulvac Bursine 2 (gyártó Fort Dodge) és Bursi-Vac (gyártó:Kemia) vakcinákat, az MB csoportból az MB (gyártó:ABIC) és BG (gyártó:RIAH) vakcinákat és végül a V877 csoportból a Poulvac Bursa Plus (gyártó Fort Dodge) vakcinát oltottuk a sejtenyészetre. A W2512 csoportból nem oltottunk le vakcinát mivel a CEVA Phylaxia által

gyártott CEVAC IBD L vakcina nem szaporodik sejtenyészetben, a csoport többi tagja pedig nem különbözik jelentősen ettől a törzstől. A palackokat legfeljebb 6 napon keresztül 37°C-on, CO₂-os termosztátban inkubáltuk és naponta ellenőriztük mikroszkóppal a sejtenyészet állapotát (az esetleges citopatogén hatást). Az inkubálást a vírusra jellemző CP hatás egyértelmű kimutatásáig folytattuk, utána a vizsgálatot lezártuk. Abban az esetben tekintettük a vakcinatörzset szövetaadaptálnak, ha a sejtenyészetben további passzálás nélkül is citopatogén hatást idézett elő.

3.14 Állatkísérletek

3.14.1 1978-ban Magyarországon izolált IBDV törzs virulenciájának vizsgálata csirkében.

Az 1978-ban, húshibrid állományban, IBD klinikai tüneteket nem okozó, de az állatokban kifejezett bursa atrophíát előidéző törzset izoláltak (P6/78) és a bursa dörzsöléket -70°C-on tárolták. A vírust 3 hetes korú SPF csirkében a fent leírtak szerint felszaporítottuk (3.5 fejezet). Az így kapott bursa homogenizátum 200 µl-rel 44 db 2 hetes SPF csirkét fertőztünk szájon keresztül. További 44 db az előbbivel megegyező korú SPF csirkét negatív kontrollként a bursa:tesztömeg index (B:B index) kiszámítására az előző csoporttól elkülönítve tartottunk. Mind két csoportból a 4. napon 4-4 állatot elvéreztettünk és a bursájukat 10%-os formalin oldatban fixáltuk szövettani vizsgálat céljából. A 7., a 14., a 21. és a 28. napon 10-10 állat testsúlyát megmértük, majd elvéreztettük őket. A kivett a bursák súlyát lemértük, 10%-os formalin oldatban fixáltuk és leadtuk szövettani vizsgálatra. A bursa:tesúly index kiszámításához először az állatok egyedi bursa:testsúly arányát számoljuk ki oly módon, hogy a bursa mg-ban mért tömegét elosztjuk az állat testsúlyának g-ban mért értékével. A B:B index kiszámításához az egyedi adatokból mintavételi időpontonként és csoportonként átlagot számolunk, majd a fertőzött csoport értékét elosztjuk a kontroll csoport bursa:testsúly értékével.

3.14.2 1997-ben Magyarországon izolált IBDV törzsek virulenciájának vizsgálata csirkében

Az 1997-ben IBD-re jellemző klinikai tüneteket mutató tojóhibrid és húshibrid állományokból származó 6 vírustörzset (Mohácson, Tószegen, Csengelén, Kabán, Pécsen és Fábiansebestyénben izolált törzsek) 11 napos embrionált SPF tojásban felszaporítottunk és az így kapott izolátumok azonosságát a kiindulási törzssel RT-PCR-t követő szekvenálással ellenőriztük. Izolátumonként 5-5 db 4 hetes korú SPF csirkét fertőztünk szájon keresztül 300

µl *allantois*-folyadékkal. A csirkéket csoportonként elkülönítve helyeztük el és kilenc napon keresztül naponta megfigyeltük őket. Az esetleges megbetegedéseket följegyeztük és az elhullott állatokat fölboncoltuk és belőlük bursa mintát szedtünk PCR vizsgálatra. A kilencedik napon a még életben maradt állatokat is elvéreztettük és bursájukból szintén vettünk mintát PCR vizsgálatra. A kapott PCR termékek közül csoportonként egyet megsekszenáltattunk, az esetleges kontamináció kizárására.

3.14.3 2004-ben Dél-Afrikában izolált IBDV törzs virulenciájának vizsgálata csirkében

A 2004-ben Dél-Afrikában 26 napos húshibrid állományból izolált D430/3/04 jelű törzset, valamint a kontrollként használt Delaware E amerikai variáns IBDV törzset 11 napos embrionált SPF tojásban folszaporítottuk. A vírusszuspenziók titerét 11 napos embrionált SPF tojás CAM-jára oltva meghatároztuk. Nyolcvan darab 3 napos korú kereskedelmi forgalomban kapható húshibrid csirkét 4 csoportra osztottunk. A maternális ellenanyag szint megállapítására 15 állatból vért vettünk és az IBDV specifikus ellenanyagok szintjét vírus neutralizációs teszttel megállapítottuk. Az első csoportot a D430/3/04 jelű dél-afrikai izolátummal, a másodikat a Delaware E nevű törzsszel, a harmadikat egy Winterfield 2512-es klasszikus virulens törzsből készült vakcina törzsszel fertőztük szájon keresztül 200 µl vírusszuspenzióval. Mind a három esetben állatonként 10^4 /200 µl titerű vírust juttatunk az állatok szervezetébe. A negyedik csoportot negatív kontrollnak hagytuk meg. A csoportokat egymástól elkülönítve tartottuk és a kísérlet végéig naponta megfigyeltük őket. Egy nappal a fertőzés után mind három fertőzött csoporthoz 5-5 db, nem fertőzött, 3 napos korú SPF csirkét raktunk szentinelnek. A húshibrid csirkékből mind a négy csoportból a 6. és a 14. napon 5-5 állat, a 21. napon pedig 10-10 állat súlyát lemértük, majd elvéreztettük őket. A boncolás során a bursájukat eltávolítottuk és a bursa súlyát lemértük, majd kettévágtuk őket. Az egyik felet 10%-os formalinban fixáltuk, majd leadtuk szövettani vizsgálatra. A másik felet PCR vizsgálat céljából lefagyasztottuk. A szentinelnek berakott SPF csirkék közül a 6. és a 14. napon 2-2 állatot kivettünk és a húshibridekhez hasonlóan mintát vettünk belőlük. A B:B indexet a P6/78 törzsnél már leírtak szerint számoltuk ki.

3.14.4 A különböző vakcinacsoportok összehasonlító vizsgálata SPF csirkében

A vakcinavírusok összehasonlító patogenitási vizsgálatát 2 hetes korú SPF csirkéken végeztük. Az állatokból 8 csoportot alakítottunk ki, melyekből 7 állat csoportot a filogenetikai vizsgálat során elkülönített 7 vakcinacsoport 1-1 reprezentáns vakcinájával per os immunizáltunk. A D78 csoportból a Nobilis Gumboro D78 vakcinát (gyártó: Intervet.), a P2

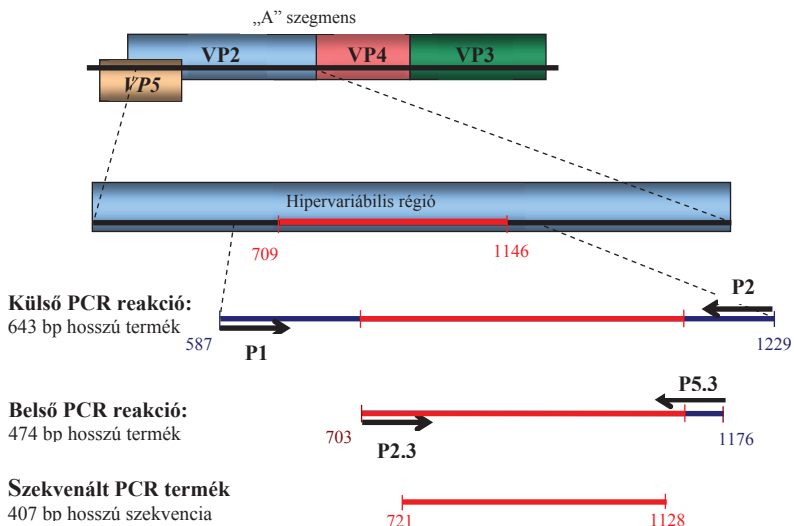
csoportból a Bursa-Vac 3 vakcinát (gyártó: Schering-Plough Animal Health), a 228E csoportból a Nobilis Gumboro 228E vakcinát (gyártó: Intervet), az STC csoportból az Avimune-F vakcinát (gyártó: Coopers Brasil Ltd.), a W2512 csoportból a CEVAC IBD L vakcinát (gyártó: CEVA-Phylaxia Zrt.), a Lukert csoportból a Poulvac Bursine 2 vakcinát (gyártó: Fort Dodge Animal Health), az MB csoportból az MB vakcinát (gyártó: ABIC), a V877 csoportból a Poulvac Bursa plus vakcinát (gyártó: Fort Dodge Animal Health) választottuk. A vakcinák titerét előzetes titrálásban embrionált SPF tojásban, illetve CEF-en meghatároztuk, majd úgy hígítottuk immunizáláshoz, hogy 1 adag vakcina (400 μ l) $10^{3.0}$ EID₅₀, illetve $10^{3.0}$ TCID₅₀ titerű vírust tartalmazzon. A vakcinázást követően hetente (7, 14, 21 és 28 nap p.v.) gyűjtöttünk mintákat. Vért vettünk szerológiai vizsgálatra (vírus neutralizáció, VN), valamint bursa mintát PCR-re és formalinban fixált bursa mintát kórszövettani vizsgálatra. A 14. napi mintavételtől kezdődően minden alkalommal B:B indexet is számítottunk (csoport átlagot). A vérsavók egyedi VN titereinek kettes alapú logaritmusát vettük, majd a log₂ titerekből számított átlag és szórás értékekkel jellemeztük az egyes csoportok immunválasztát. A vakcinák megeredésének összehasonlítására a szeropozitív csirkék arányát is nyomon követtük (azokat az állatokat tekintettük pozitívnak, melyek VN titere legalább 1:10 volt). Azokban az esetekben, amikor a csirkék egy része szeronegatívnak bizonyult, a savókat BioChek IBD ELISA kittel is megvizsgáltuk, a gyártó által mellékelt leírásnak megfelelően végezve a vizsgálatot. Pozitivitási határként a gyártó által megadott 391-es titert alkalmaztuk, a kapott eredmények alapján a savókat pozitív vagy negatív kategóriákba soroltuk be.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Molekuláris biológiai módszer kidolgozása a mezei IBDV törzsek kimutatására és egymástól való elkülönítésére

4.1.1 Nested PCR kidolgozása

Két korábban publikált primer pár felhasználásával egy random primert alkalmazó RT-reakciót követő kettős (nested) PCR rendszert dolgoztunk ki. Ez a VP2 hipervariábilis régióját kódoló génszakasz 474 bp hosszú szakaszát szaporítja fel és alkalmas a vírus kimutatására közvetlenül szervből vagy liofilizált vakcina készítményből (9. ábra; *Iván és mtsi., 2005*). Az irodalmi primereket úgy választottuk meg, hogy a belső PCR primereinek tapadási helyei a külső PCR által felszaporított szakaszon belül helyezkedjenek el. A külső PCR reakciót *Liu és munkatársai (1994)* által leírt primerekkel és PCR beállításokkal végeztük, ami a VP2 gén 587. és 1229. nukleinsava közötti szakaszt szaporítja fel, amely a hipervariábilis régiót is tartalmazza. Az így kapott 643 bp hosszú PCR terméket használtuk a belső PCR templátjaként.

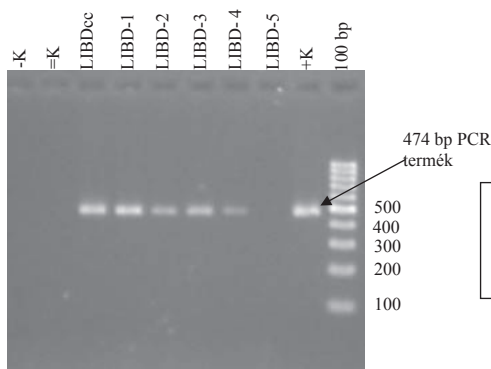


9. ábra A nested PCR rendszer által felszaporított IBDV génszakaszok hossza és elhelyezkedése a genomban

A belső PCR reakciót *Lin* és munkatársai (1993) által leírt primerekkel végeztük, amelyek a VP2 gén 703. és 1176. nukleotidja közötti régiót szaporítják föl. A specificitás növelése érdekében az eredeti cikkben leírtakhoz képest csökkentettük a Mg^{2+} és a primerek koncentrációját, valamint a ciklusszámot. A kapott PCR terméket restriktációs enzimekkel emésztve, a hasításikép alapján a vakcinák nagy része, a variáns törzsek, a nagyvirulenciájú törzsek és a belőlük készült vakcinák elkülöníthetők egymástól. A tisztított PCR termék megszekvenálásával és szekvencia-analízisével további információhoz jutottunk.

4.1.2 A víruskimutatási módszer érzékenysége

A módszer kidolgozása után a nested PCR reakción alapuló víruskimutatás érzékenységét meghatároztuk. A vizsgálathoz sejt kultúrához-adaptált IBDV vakcinatörzs (LIBD törzs, CEVAC Gumbo L vakcina) titerét primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészeten plakktitrálással módszerrel meghatároztuk. Az ismert titerű vírusszuspenzióból 10-es léptékű hígítási sort készítettünk és ennek a tagjait használtuk a víruskimutatáshoz. A mintákból a vírusrnukleinsavat kitisztítottuk, cDNS-é ártírtuk és ezt alkalmaztuk a nested PCR reakcióban templátként. A kapott PCR terméket agaróz gélen megfutattuk és megállapítottuk azt a legnagyobb hígítást, ahol a PCR reakció még pozitív volt. Ez alapján a reakcióba bevitt minta mennyiségét és a minta feldolgozása során történt hígulásokat is figyelembe véve kiszámítottuk a víruskimutatás hatékonyságát, valamint az RNS tisztítást és az RT reakciót 100%-os hatékonyságúnak feltételezve, meghatároztuk külön a PCR érzékenységét is (a teljes nested PCR-re). A plakktitrálás alapján a LIBD vírus titere $10^{7.1}$ PFU/ml volt. A nested PCR reakció a -4 hígításig volt pozitív (10. ábra). Ez alapján a víruskimutatási módszer érzékenysége $10^{2.8}$ PFU-nak és a nested PCR érzékenysége pedig $10^{1.4}$ PFU-nak adódott.



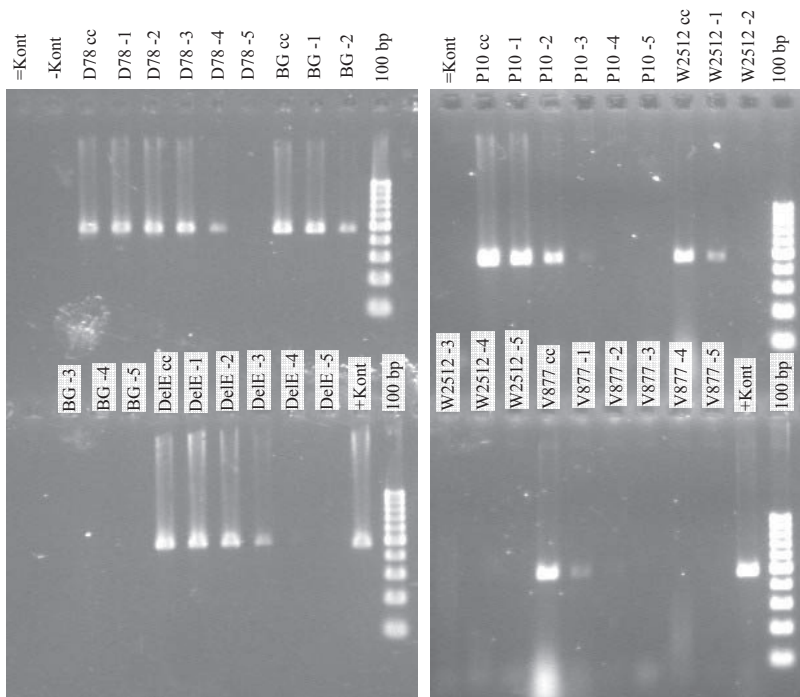
10. ábra Nested PCR reakció érzékenységének vizsgálata sejtenyészeten adaptált LIBD IBDV vakcina törzssel.

Később, miután a különböző IBDV csoportok képviselőiből elegendő törzs állt a rendelkezésünkre, megvizsgáltuk a nested PCR reakción alapuló víruskimutatási módszer érzékenységét különböző filogenetikai csoportba tartozó törzseken is. A vírusok titerét is meghatároztuk primer csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyészeten, 96-lyukú szövettenyésztő lemezen titrálva határoztuk meg (költségsége és időigényessége miatt a plakktitrálást már nem használjuk vírustiter meghatározásra). A vizsgálatba a D78 sejtenyészethez adaptált vakcinatörzset, a BG nagyvirulenciájú törzsből készített vakcinatörzs sejtenyészethez adaptált változatát és a Delaware E (DeE) amerikai variáns törzs sejtenyészethez adaptált változatát vontuk be. Embrionált SPF tojás *chorio-allantois*-membránjára oltva titráltuk meg a P10 szubklinikai törzset, a Winterfield 2512 (W2512) klasszikus virulens törzsből készített vakcinatörzset és a V877 ausztrál klasszikus virulens törzsből származó vakcinatörzset. A vírusokból 10-es léptékű hígítási sort készítettünk és a hígításokat mintaként felhasználva, a vírus nukleinsavát kitisztítottuk, cDNS-é átírtuk és nested PCR-rel a vírusnukleinsavakat felszaporítottuk. A kapott PCR termékeket agaróz gélen megfuttatva megállapítottuk azt a legnagyobb hígítást, ahol a PCR termék még látható volt (11. ábra). A vírusok titere alapján a bevitt minta mennyiség és a minta feldolgozás során fellépő hígulást figyelembe véve kiszámoltuk azt a vírustitert, amit a nested PCR a különböző típusú IBD vírusokból még ki tudott mutatni. Ezen túl a hígítások figyelembevételével, valamint az RNS tisztítást és az RT reakciót 100%-os hatékonyságúnak véve megállapítottuk a nested PCR reakció érzékenységét is.

Törzs neve	Vírus titer	Az utolsó PCR pozitív hígítás	Víruskimutatási módszer érzékenysége	Nested PCR érzékenysége
D78	$10^{7,6}$ TCID ₅₀ /0,1ml	-4	$10^{3,6}$ TCID ₅₀	$10^{1,8}$ TCID ₅₀
BG	$10^{4,1}$ TCID ₅₀ /0,1ml	-2	$10^{2,1}$ TCID ₅₀	$10^{0,3}$ TCID ₅₀
Del E	$10^{6,9}$ TCID ₅₀ /0,1ml	-3	$10^{3,9}$ TCID ₅₀	$10^{2,1}$ TCID ₅₀
P10	$10^{5,1}$ EID ₅₀ /0,2ml	-3	$10^{3,1}$ EID ₅₀	$10^{1,7}$ EID ₅₀
W2512	$10^{4,1}$ EID ₅₀ /0,2ml	-1	$10^{3,1}$ EID ₅₀	$10^{1,7}$ EID ₅₀
V877	$10^{4,0}$ EID ₅₀ /0,2ml	-1	$10^{3,0}$ EID ₅₀	$10^{1,7}$ EID ₅₀

1. Táblázat A víruskimutatási módszer és a nested PCR érzékenysége

A víruskimutatási módszer érzékenysége a sejtkultúrához adaptált vírusok esetében $10^{2,1}$ - $10^{3,9}$ TCID₅₀ között változott. A nested PCR érzékenysége pedig $10^{0,3}$ - $10^{2,1}$ TCID₅₀ között. Az embrionált SPF tojáson titrált vírusszuspenziók esetében a módszer érzékenysége $10^{3,0}$ - $10^{3,1}$ EID₅₀ volt, ami gyakorlatilag azonos vírusszámot jelent. A nested PCR érzékenysége pedig $10^{1,7}$ EID₅₀ volt mindhárom esetben.



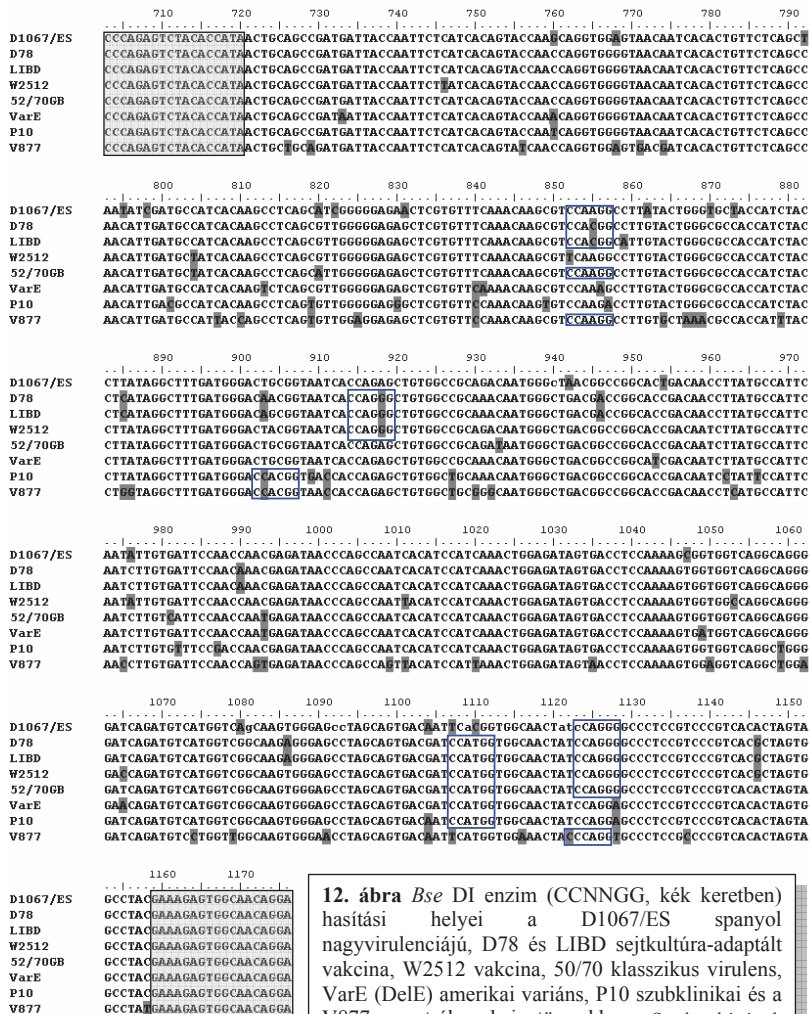
11. ábra A RT-nested PCR rendszeren alapuló víruskimutatási módszer érzékenysége különböző vírustörzsek esetében.

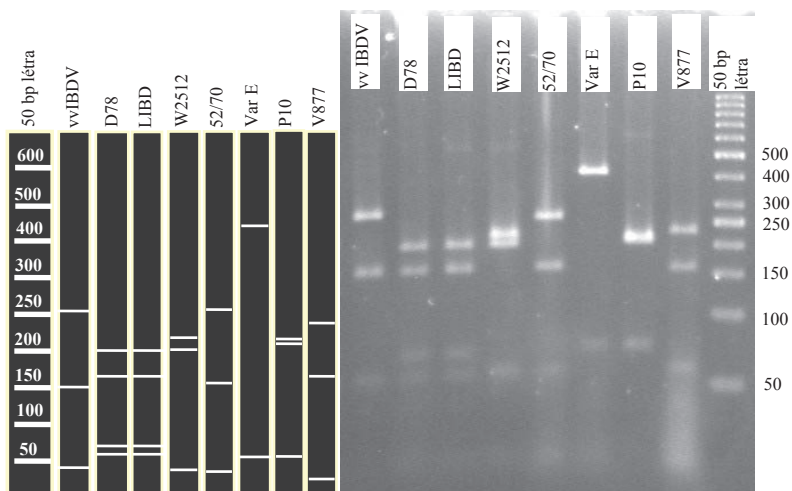
D78 szövet adaptált vakcina törzs, BG nagyvirulenciájú törzsből készített vakcina törzs, DelE amerikai variáns törzs, P10 szubklinikai törzs, W2512 klasszikus virulens törzsből készült vakcina törzs, V877 ausztrál klasszikus virulens törzsből készült vakcina törzs. A törzs jelzése mögött a hígítás mértéke szerepel

4.1.3 RFLP analízis

Az RFLP analízishez olyan restrikciós enzimet kerestünk, amivel bizonyos vírustörzseket gyorsan el lehet különíteni és nagyszámú minta esetén segítséget nyújt a szekvenálás előtt a törzseket szűrésében. A keresést különböző, a GenBank-ból és saját szekvenálásokból származó szekvenciákon (VP2 hipervariábilis régióján) végeztük a „BioEdit sequence alignment editor” program restrikciós enzim térképező moduljának segítségével. A kiválasztás szempontjai a következők voltak: (i) az adott enzim a PCR terméket lehetőleg egynél többször, de ötnél kevesebbszer hasítsa (ii). A hasítóhelyek lehetőleg elég távol

legyenek egymástól ahhoz, hogy a keletkezett fragmentek hossza meghaladja a 20-30 bp-t, ami már a gélen is látható. (iii) A különböző törzscsoportok esetében egymástól elkülöníthető hasítási képet ad az enzim. Ezeknek a kritériumoknak a *Bse* DI restrikciós enzim felelt meg legjobban (12.-13. ábra).



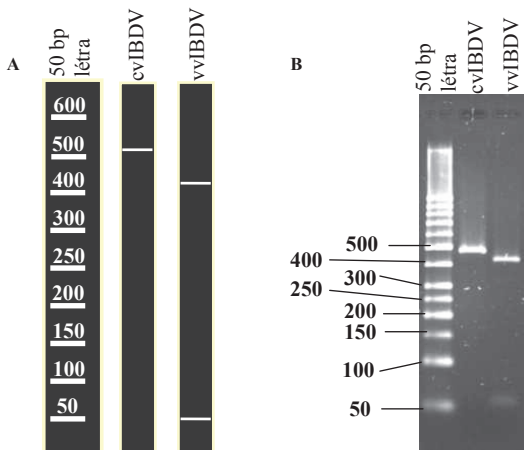


13. ábra Különböző genetikai csoportba tartozó IBDV törzsek elkülönítése RFLP analízis alapján.

D78 és LIBD sejt kultúra-adaptált vakcina törzsek, W2512 vakcina, 52/70 klasszikus virulens törzs, VarE (DelE) amerikai variáns törzs, P10 szubklinikai és V877 ausztrál vakcina törzsek.

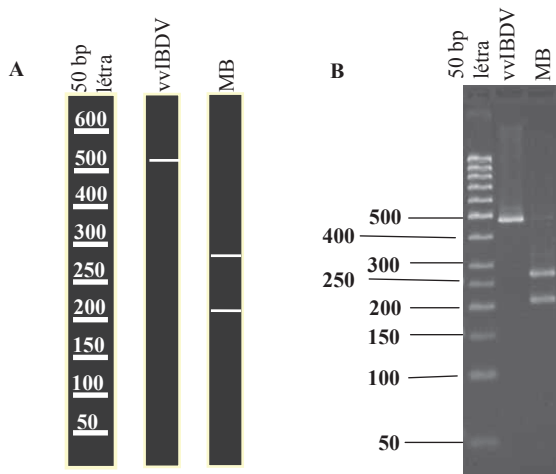
A *Bse* DI enzim használatával a sejt kultúra-adaptált vakcina törzsek, a klasszikus virulens törzsekből származó vakcinák, az amerikai variánsok, a szubklinikai törzsek és az ausztrál klasszikus virulens törzsből készült vakcinák jórészt megkülönböztethetők egymástól valamint elkülöníthetők a klasszikus virulens és a nagyvirulenciájú törzsektől. A klasszikus virulens és a nagyvirulenciájú törzsek ezzel a módszerrel nem különíthetők el.

Irodalmi adatok alapján a nagyvirulenciájú törzéseket a klasszikus virulens törzsektől *Bsp* MI enzim segítségével lehet megkülönböztetni (Zierenberg és mtsi, 2001). Az enzim felismerő helye (GCA↓GTT), a VP2 fehérje 222. pozícióban lévő aminosavát kódoló tripletet is magában foglalja és csak akkor hasít, ha a nagyvirulenciájú törzsekre jellemző alanin (GCA) van ebben a pozícióban (14. ábra).



14. ábra Nagyvirulenciájú törzsek kimutatása *Bsp* MI enzim segítségével
 A.) a restrikciós emésztés sematikus ábrája a hasítási hely alapján számított fragment hosszokkal. B.) Egy klasszikus virulens és egy nagyvirulenciájú törzs hasítási képének összehasonlítása.

Diagnosztikai vizsgálataink során kiderült, hogy a nagyvirulenciájú törzseket a belőlük attenuálással készített vakcina törzsektől (MB és BG törzs) *Bsp* MI emésztéssel nem lehet elkülöníteni, mivel ezek is tartalmazzák a nagyvirulenciájú törzsekre jellemző *Bsp* MI felismerő helyet. Ezért a vad nagyvirulenciájú törzsektől való elkülönítésük érdekében a vakcinák és a vad nagyvirulenciájú törzsek nukleotid szekvenciájának felhasználásával egy másik restrikciós enzimet kerestünk. A célnak az *Eco* 91I enzim tűnt a legmegfelelőbbnek, ami a vad törzseket nem hasítja, csak a belőlük származó vakcinatörzseket. Az enzim nagyvirulenciájú törzsekből készített két vakcina törzsre jellemző, a VP2 fehérje 272. pozíciójában lévő treonint kódoló tripletet (ACC) ismeri fel (G↓GTNAC↑C). Vad nagyvirulenciájú törzsekben ebben a pozícióban mindig izoleucin (ATC) található (15. ábra).



15. ábra Nagyvirulenciájú törzsek és a belőlük származó vakcina törzsek kimutatása *Eco* 91I enzim segítségével

A.) a restrikciós emésztés sematikus ábrája a hasítási hely alapján számított fragment hosszokkal. B.) Egy vad nagyvirulenciájú törzs és egy nagyvirulenciájú törzsből származó vakcina hasítási képének összehasonlítása.

Ecuadorból 2008-ban több olyan állományból kaptunk mintákat, amelyeket W2512 törzset tartalmazó vakcinával immunizáltak. Az *Bse* DI emésztést követő RFLP analízis minden állományban a vakcinavírus szaporodását igazolta. Néhány véletlenszerűen kiválasztott minta szekvenálást követő filogenetikai vizsgálata viszont, a vakcinavírus helyett variáns vírusok jelenlétét állapította meg. Ezeknek a variánsoknak a szekvenancia-analíziséből kiderült, hogy bennük a *Bse* DI hasítóhelyek ugyanott helyezkednek, mint a W2512-es vakcinatörzsben (16. ábra, következő oldal).

A két törzs elkülönítésére egy másik restrikciós enzimet találtunk, az *Ssp* I -et, amelynek csak a W2512 vakcinatörzsben található vágáshelye, az ecuadori variáns törzseket nem hasítja (17. ábra, következő oldal). Az *Ssp* I emésztés ugyanazt az eredményt adja mint a filogenetikai analízis, sőt egy esetben (D923/7 jelű minta) mind a két vírustörzs egyidejű jelenlétét is sikerült vele kimutatni.

710 720 730 740 750 760 770 780 790
W2512 C C C A G A G T C T A C C A C T A A C T G C A G C C G A T G A T T A C C A A T T C T T A T C A G A T A C C A A C C A A G G T G G G T A A C A A T C A C A C T G T T C T C A G C C
D923/6/08EC C C C A G A G T C T A C C A C T A A C T G C A G C C G A T T A C C A A T T C T C A T C A C A A T C C A A C A A G G T G G G T A A C G A T C A C A C T G T T C T C A G C C

800 810 820 830 840 850 860 870 880
W2512 A A C A T T G A T G C T A T C A A A G C C T C A G C G T T G G G G A G A G C T G T G T T C A A A C A A G C G T C A A G G C C T T G T A C T G G G C G C A C C A T C T A T G C C A T C
D923/6/08EC A A C A T T G A T G C T A T C A A A G C C T C A G C A T T G G G G A G A G C T T G T G T C A A A A C A A G C G T C A A A G C C T T G T A C T G G G C G C A C C A T C T A T G C C A T C

890 900 910 920 930 940 950 960 970
W2512 C T T A T A G G C C T T T G A T G G G A C T A C G G T A A T C A C C A G G C T G T G G C C G C A G A C A A T G G G C T G A C G G C C G G C A C C A A T C T A T G C C A T T C
D923/6/08EC C T T A T A G G C C T T T G A T G G G A C T A C C G G T A A T C A C C A G G C T G T G A G C C G C A A A C A A T G G G C T G A C G G C C G G C A T C G A C A A T C T A T G C C A T T C

Bse DI

980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060
W2512 A A T A T T G T G A T T C C A A C C A A C G A G A T A A C C A G C C A A T T A C A T C C A T C A A A C T G G A G A T A G T G A C C T C C A A A A G T G G T G G C C A G G C A G G G
D923/6/08EC A A T C T T G T G A T T C C A A C C A A C G A G A T A A C C A G C C G A T C A C A T C C A T C A A A C T G G A G A T A G T G A C A T C A A A A G T A T G T G T C A G G C A G G G

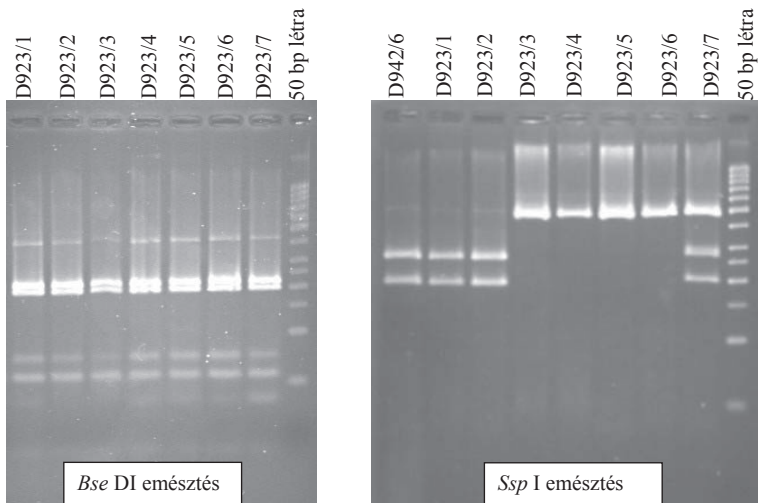
Ssp I

1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150
W2512 G A C C A G A T G C A T G G T C G G C A A G T G G G A G C T A G C A G T G A C G A T C A T G G G G G C A A C T A T C A G G G G C C T C C G T C C C G T C A C G C T A G T G
D923/6/08EC G A T C A G A T G C A T G G T C G G C A A G T G G G A G C T A G C A G T G A C G A T C A T G G G G G C A A C T A T C A G G G G C C T C C G T C C C G T C A C G C T A G T G

Bse DI Bse DI

1160 1170
W2512 G C C T A C C A A A G A G T G G C A A C A G G A
D923/6/08EC G C C T A C C A A A G A G T G G C A A C A G G A

16. ábra *Bse* DI (CCNNGG, kék keretben) és *Ssp* I (AATATT, piros keretben) restrikciós enzimek hasítási helyei a W2512 vakcina törzsben és a D923/6 jelű ecuadori mintákban. Szürke háttérrel a primerek szekvenciáját emeltük ki.



17. ábra Ecuadori minták (D923/1-7) restrikciós hasítási képei.

D942/6 jelű W2512 vakcina törzset tartalmazó kontroll minta (szekvenálással megerősítve). A D923/1-2 W2512 vakcinatörzset tartalmazó, a D923/3-6 variáns vírust tartalmazó minták. A D923/7 mindkét vírustörzset tartalmazó minta.

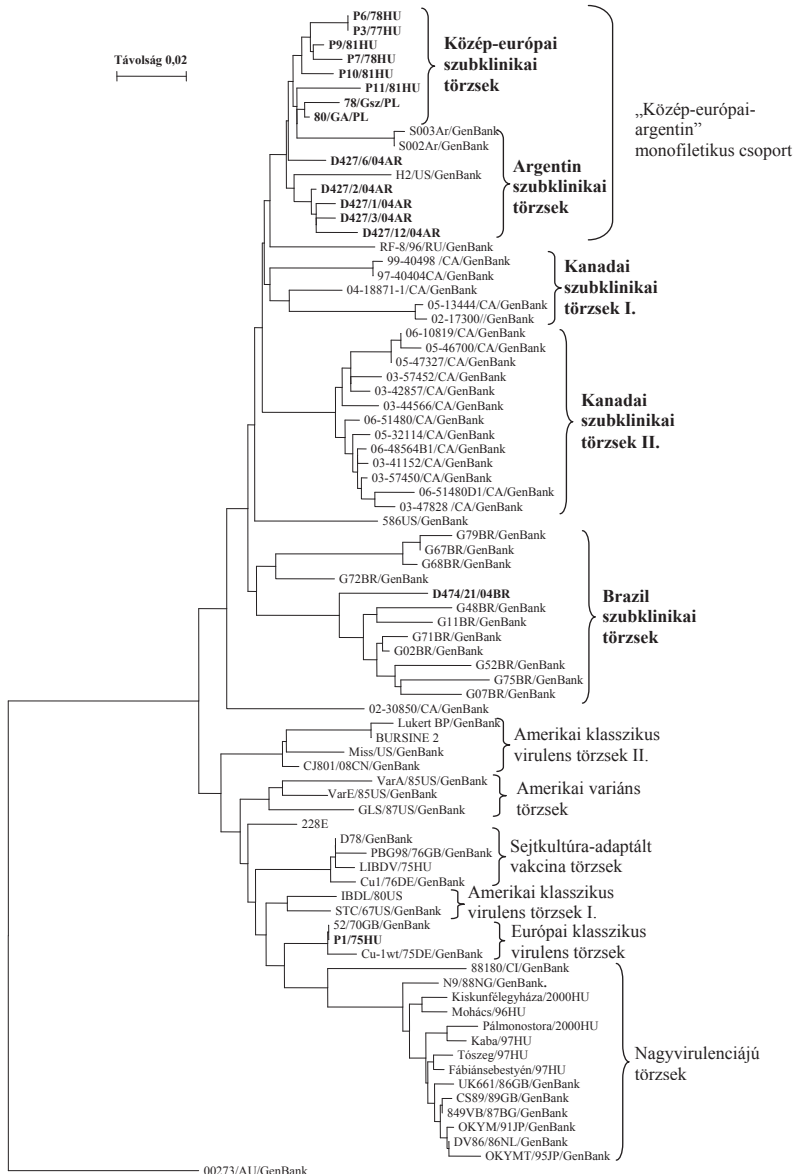
4.2 Magyarországon 1975-1981 között izolált IBDV törzsek filogenetikai vizsgálata

4.2.1 Vizsgált vírusok

Magyarországon 1975-ben Palya Vilmos és munkatársai izolálták először az IBD vírusát, súlyos tüneteket és elhullást mutató, 6 hetes korú tojóhibrid állományból. Ezt az első hazai izolátumot és az 1977-1981 között főleg szubklinikai formában fertőződött húshibrid állományokból izolált további hat IBDV törzs filogenetikai viszonyait vizsgáltuk meg.

4.2.2 Filogenetikai eredmények

Az **első hazai izolátum** nukleotid szekvenciája teljesen megegyezett az 1970-ben, Európában elsőként izolált klasszikus virulens 52/70 törzsével a VP2 fehérje hipervariábilis régióján. Az 1977-1981 között izolált törzsek, ezzel szemben egy teljesen új, a klasszikus virulens vírusoktól független csoportot hoztak létre (18. ábra, 42. oldal). E csoporton belül az 1977-ben izolált P3 törzs és az 1978-ban izolált P6 törzs nukleotid szekvenciája megegyezett. A csoport további négy tagjából három 98,2-98,7%-os nukleotid szekvencia hasonlóságot mutatott a P3 törzsszel, a negyedik, az 1981-ben izolált P11 viszont ezekről jobban különbözött. Itt a hasonlóság csak 96,6% volt, ami 13 nukleotid különbséget takar. Két lengyel izolátum, az 1978-ban izolált 78/Gsz és az 1980-ban izolált 80/GA 97,1-98,8% hasonlóságot mutattak a magyar törzsekkel és velük egy közös csoportot alkotnak, amit **közép-európai szubklinikai csoportnak** neveztünk el. Ezzel a csoporttal mutat szoros rokonságot (96,1-98,4% hasonlóság) a 2004-ben általunk Argentínából izolált öt vírustörzs valamint, a *Remorini* és munkatársai által 2006-ban leírt két argentin törzs. A filogenetikai fán szintén ebbe a csoportba sorolódik egy *Jackwood* és munkatársai (2001) által leírt amerikai izolátum, a H2 is. A H2 törzs az argentin törzsekkel 95,8 és 97,1% közötti hasonlóságot mutat, míg a közép-európai törzsek esetében ez az érték 95,3-96,1% között változik. Ezek a törzsek, azaz a közép-európai és az argentin törzsek az amerikai izolátummal együtt, egyetlen monofiletikus csoportot alkotnak („közép-európai-argentin” csoport). Ehhez a csoporthoz közel, de attól elkülönülve található, egy 1996-ban, Oroszországban izolált törzs (RF-8 törzs, GenBank-i szekvencia), ami a közép-európai törzsekkel 95,1-96,1%-os, míg az argentin törzsekkel 94,8-96,1%-os hasonlóságot mutat. A „közép-európai-argentin” csoporton túl, még két kanadai törzsből álló (kanadai I. és II.) és egy brazil törzsből álló csoport együttesen alkotja a szubklinikai vírusok nagy csoportját (18. ábra).



18. ábra Az 1975-1981 között Magyarországon izolált IBDV törzsek filogenetikai kapcsolatai. Vastag betűs törzsek a vizsgálatban résztvevő általunk szekvenált törzsek (az utolsó 4 karakter az izolálás évét és helyét-két betűs országkód- jelzi).

A első kanadai csoportot öt, 1997 és 2005 között *Ojkic* és munkatársai (2007) által leírt törzs alkotja. Ebben a csoportban a törzsek nukleotid szekvenciájának hasonlósága meglehetősen tág határok között ingadozik 93,9-99,7%. A „közép-európai-argentin” csoporttal 92,8-96,9%-os hasonlóságot mutatnak. A második kanadai csoportba tizenhárom 2003 és 2006 között szintén *Ojkic* és munkatársai (2007) által leírt törzs tartozik. A törzsek hasonlósága a második kanadai csoportban 96,4-99,4% között változik, ami az első csoportba tartozó kanadai törzseknel megfigyeltnél kisebb és a „közép-európai-argentin” csoporton belüli hasonlóság értékekkel azonos. A második kanadai csoport a „közép-európai-argentin” csoporthoz mért hasonlósága az első kanadai csoportéhoz hasonlóan 92,8-96,1% között mozog. A kanadai és „közép-európai-argentin” csoportoktól elkülönülve egy amerikai izolátum (586-os törzs) található, amely a fenti csoportok törzseivel mindössze 92,5-95,6% hasonlóságot mutat. A szubklinikai törzsek utolsó nagy csoportját a Brazíliából származó *Ikuta* és munkatársai (2001) által leírt törzsek alkotják. A csoporton belüli hasonlóság meglehetősen tág határok között változik: 90,6-99,1%. A brazil csoport a „közép-európai-argentin” csoporttal 89,4-95,5%, míg a két kanadai csoport törzseivel 88,6-94,7% hasonlóságot mutatott. Az eddig felsorolt csoportokon és törzseken kívül még egy Kanadában 2002-ben izolált, (02-30850 jelzésű) törzs tartozik a szubklinikai törzsek közé, a többi törzstől teljesen különállva. A hasonlóság e kanadai törzs és „közép-európai-argentin” törzscsoport törzsei között 92,8-94,3%, a többi kanadai törzshöz pedig mindössze 91,2-93,8%-os.

A szubklinikai IBDV törzsek az európai klasszikus virulens törzsekkel (pl. 52/70, Cu1-wt) 86,9-94,3%-os hasonlóságot mutatnak. Az amerikai klasszikus virulens és belőlük készített vakcinák csoportjai közül az I-es (STC-csoport) 88,6-94,1%-os, míg a II-es (Lukert-csoport) ennél egy kicsit kisebb 86,5-93,3%-os hasonlóságot mutat. A sejtenyészethez adaptált vakcina törzsek nukleotid hasonlósága 87,8-94,1%-os a szubklinikai törzsekéhez viszonyítva, ami megegyezik az amerikai variáns törzsek szubklinikai törzsekhez mért hasonlóságával (87,8-94,1%). A szubklinikai törzsek nagyvirulenciájú törzsekhez viszonyított hasonlósága viszont ezeknél jóval kisebb 85,7-92,5%. Az ausztrál klasszikus virulens törzsekhez képest ez a hasonlóság még kisebb 84,9-88,4%.

A szubklinikai törzsek aminosav szekvenciájának összehasonlítását a 19. ábra tartalmazza (ld. következő oldal). A szubklinikai törzsekre jellemző aminosavak a következők: a VP2 fehérje 222. pozíciójában szerin, 272. pozíciójában treonin, a 279. pozíciójában aszparagin, a 289. pozíciójában prolin, a 290. pozíciójában izoleucin és végül a 296. pozíciójában fenilalanin. A „közép-európai-argentin” csoportra ezeken kívül még jellemző a 245. pozícióban található glutamin is. Ez az aminosav a csoport törzsei közül csak az amerikai H2 törzsben nem

4.2.3 1977 és 1981 között Magyarországon izolált IBDV törzsek szaporodási képességének vizsgálata nem-limfoid sejtenyészetben

Öt 1977 és 1981 között Magyarországon izolált szubklinikai IBDV törzssel oltott sejtenyészet közül az inkubáció 6. napjára egyiken sem látszott vírushatásra utaló citopatogén hatás. Ez alapján megállapítható, hogy a szubklinikai törzsek nem képesek a nem-limfoid sejtenyészetekben szaporodni.

4.2.4 1978-ban Magyarországon izolált IBDV törzs virulenciájának vizsgálata csirkében

A fertőzést követő 28 nap alatt sem klinikai tünetek, sem elhullás nem jelentkezett az IBDV hatására. A fertőző vírus hatására már a fertőzést követő 4. napon kórbonctani vizsgálat során atrofizált (sorvadt) bursát, hyperplasiás (megnagyobbodott, kötőszövetes állománya felszaporodott) lépet találtunk. A bursa kórszövettani vizsgálata során az IBD-re jellemző, félheveny-idült stádiumú elváltozásokat (follikulusokban enyhe, diffúz vakuolizáció, limfocita deplécio (kiürülés), valamint az interfollikuláris sövények megvastagodása és intaepitheliális ciszták) tapasztaltunk. A klasszikus virulens törzsektől eltérően, jelentős gyulladást nem találtunk. A 7. napra p.i. (*post-infection*) a bursa atrófia még szembeötlőbb lett, a fertőzött csoport B:B indexe 0,69-re csökkent. A kórszövettani elváltozások a 4. napon látotthoz hasonlóak, de kissé előrehaladottabbak voltak: a limfociták kiürülése és az interfollikuláris kötőszövet megvastagodása fokozódott. A bursa sorvadtsága a 14. napon p.i. volt a legsúlyosabb, amikor a virulens IBDV törzsekre jellemzően alacsony, csupán 0,26 B:B indexet mértünk. Továbbra is jelentős limfocita elszegényedés jellemezte a bursákat, ugyanakkor a kórszövettani vizsgálat során már részben, illetve teljesen regenerálódott follikulusokat, továbbá számos regenerációs hámszejt sziget is találtunk. A 21. napi mintavétel során már a B:B index alapján, azaz makroszkóposan is, megfigyelhető volt a bursa regenerálódása (B:B index 0,45-re nőtt), ami a kórszövettani vizsgálat eredménye alapján a 28. napra jelentősen előrehaladt (a follikulusok nagy részében a limfociták újratelepültek, ugyanakkor a B:B index már nem változott jelentősen, 0,49 volt a 28. napon).

4.3 Magyarországon 1995-2008 között izolált IBDV törzsek filogenetikai vizsgálata

4.3.1 Vizsgált vírusok

Huszonkilenc, 1995 és 2008 között izolált magyarországi IBDV törzs filogenetikai viszonyait vizsgáltuk. A törzsek az ország különböző területéről, más-más telepről származtak, olyan

húshibrid vagy tojóhibrid állományokból, amelyek a jelentős elhullás mellett a fertőző bursitisre jellemző tüneteket mutatták (20.ábra).



20. ábra Az 1995-2008 között Magyarországon izolált IBDV törzsek származási helyei csoportonként jelölve.

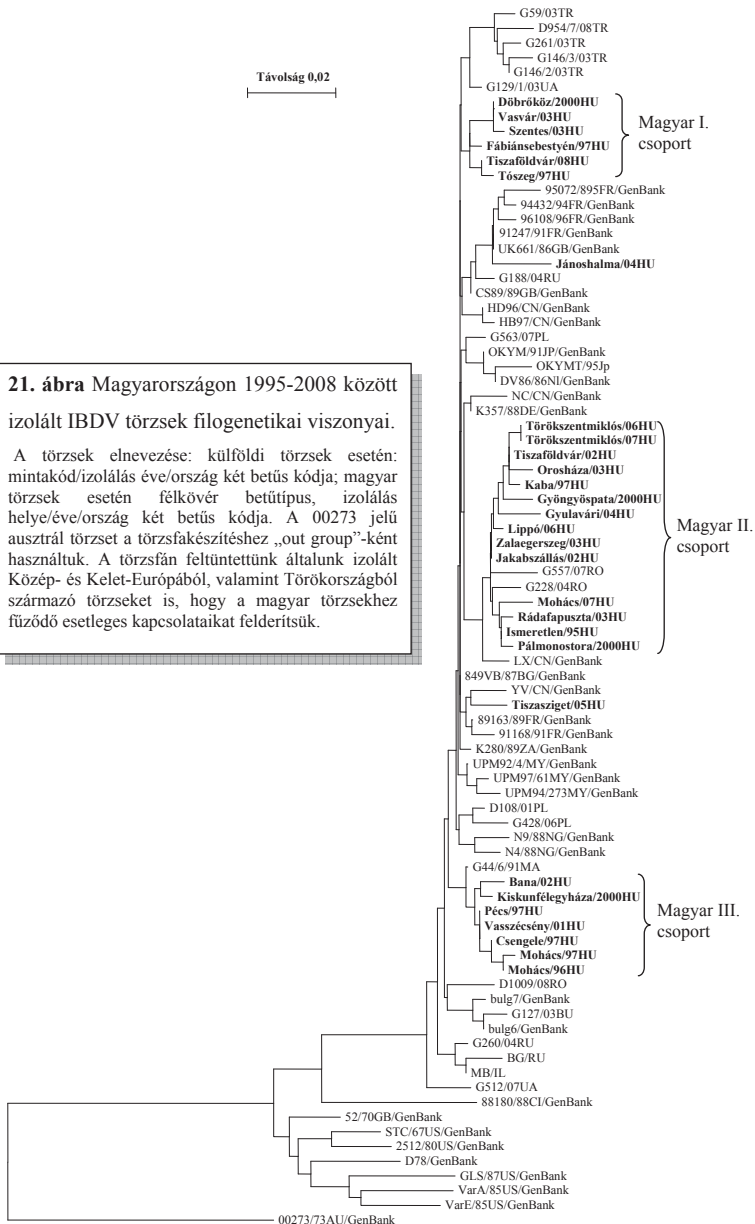
4.3.2 Filogenetikai eredmények

Mind a huszonkilenc magyarországi izolátum a **nagyvirulenciájú IBDV törzsek** csoportjába sorolódott a VP2 fehérje hipervariábilis régióját kódoló nukleinsav szekvenciák filogenetikai vizsgálata alapján. Ezek a nagyvirulenciájú törzsek három, egymástól jól elkülönülő csoportra oszlottak. A három nagy csoporton kívül további két izolátum a többiekől eltérően más-más külföldi törzsekkel mutatott szoros rokonságot (21. ábra). Az első csoportban hat 1997 és 2008 között izolált törzs található. A második csoportot tizennégy 1995 és 2007 között izolált törzs alkotja, a harmadik csoportba pedig hét 1996 és 2002 között izolált törzs tartozik. Az első csoport törzseiben az 1987-ben Belgiumban izolált 849VB referens törzshöz viszonyítva csupán egy, az egész csoportra jellemző nukleotid változás található: a 840. pozícióban citozin helyett timin van. A második csoportban a magyar törzseken kívül még két román izolátum található, egy 2004-ből egy pedig 2007-ből. A csoport törzsei egy 1997-ben,

Pekingben izolált törzzsel mutatnak szoros rokonságot. A második csoportra két jellemző nukleinsav változást találunk a referens törzshöz képest, mind a 1047-es, mind pedig a 1050-es pozíciókban timin helyett citozin található. A harmadik csoport törzsei egy 1991-ből származó marokkói izolátummal alkotnak közös csoportot. Erre a csoportra is két csoport specifikus nukleinsav változás jellemző: a 867. pozícióban glutamin helyett adenin, míg a 870. pozícióban timin helyett citozin található. A magyar csoportoktól független két izolátum közül a 2004-ben, Jánoshalmán izolált törzs az 1989-ben, Angliában izolált UK661 referencia törzzsel és Franciaországban 1991 és 1996 között izolált törzsekkel formál monofiletikus csoportot. Erre a csoportra jellemzően a 732. pozícióban lévő timin helyett citozin és a 942. pozícióban lévő adenin helyett pedig guanin található a 849VB törzshöz képest. A másik 2005-ben, Tiszaszigeten izolált törzs, egy 2000-ben, Pekingben izolált nagyvirulenciájú törzzsel és két 1989-ben és 1991-ben izolált francia törzzsel alkotott közös csoportot. Ebben a csoportban csoportspecifikus nukleinsav változást nem tapasztaltunk.

A magyar nagyvirulenciájú törzsek és a 849VB referencia törzs között - három izolátum kivételével - aminosav különbséget nem lehetett kimutatni. A három kivétel közül az egyik a második magyar II. csoportba tartozó, 2004-ben Gyulavárin izolált törzs, melynek estében a 212. pozícióban lévő aminosav változott aszparaginsavról aszparaginre, ami az első hidrofíli régiót alkotó P_{BC} hurok első aminosava. A második esetben, szintén 2004-ben, de Jánoshalmán izolált törzsben a 234. aminosav változott izoleucinről metioninre. A harmadik a 2007-ben Mohácson izolált törzs (magyar II. csoport tagja), amelyben a 252. pozícióban lévő valin változott izoleucinre.

A környező országokból származó nagyvirulenciájú IBDV izolátumok vizsgálata alapján - a két román törzset kivéve -, sem a lengyel, sem az ukrán, sem a bolgár, sem pedig az orosz törzsek nem állnak szoros rokonsági kapcsolatban a magyarországi izolátumokkal.



4.3.3 1997-ben Magyarországon izolált IBDV törzsek virulenciájának vizsgálata csirkében

A tojáson felszaporított 6 IBDV törzs szekvenciája minden esetben megegyezett a klinikai mintából meghatározott szekvenciával. A fábiánsebestyéni, a kabai és a csengelei izolátumok esetében a megfertőzött állatok 40%-a (ötből kettő), míg a mohácsi, a tószegi és a pécsi izolátum estén az állatok 60%-a (ötből három) elhullott. A megbetegedések jellemzően a harmadik napra estek, az IBD tüneteit mutató állatok bágyadtak voltak, tollukat borzolták és híg hasmenésük volt. A beteg állatok nagyrésze még aznap vagy a negyedik napra (p.i.) elhullott. Az elhullott állatok bursája minden esetben erősen duzzadt, kocsonyás volt, sok esetben bevérzésekkel, továbbá a vázizmozatban is sok helyütt bevérzések voltak. A vizsgálat végéig életben maradt állatok bursája már erősen atrofizált volt, sok esetben bevérzésekkel, de ezen állatok vázizmaiban vérzések nem voltak. Mind az elhullott, mind pedig a túlélő állatok bursájából a vírust sikerült kimutatni és a csoportonként kiválasztott minták szekvenciája is megegyezett a fertőző törzsével.

4.4 Dél-afrikai variáns IBDV törzsek jellemzése

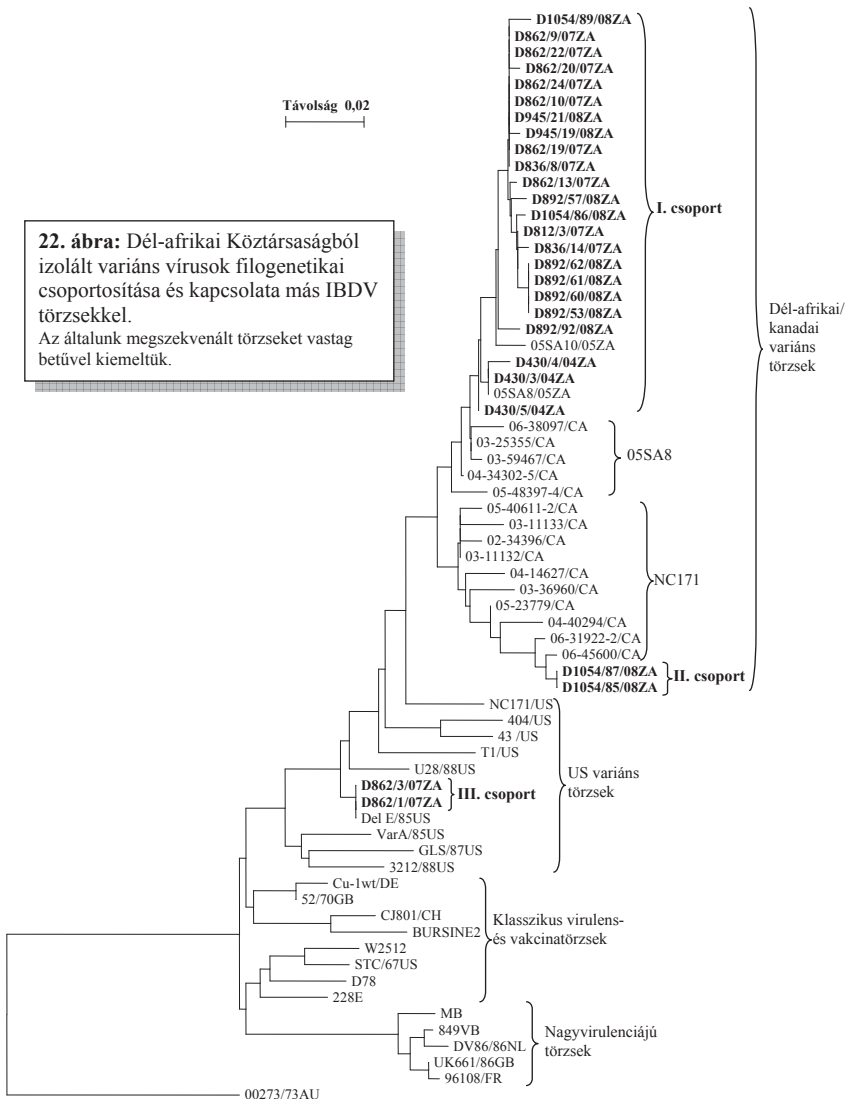
4.4.1 Vizsgált törzsek

A Dél-afrikai Köztársaság területéről 2004 és 2008 között 253 különböző húshibrid állományból kaptunk bursa mintákat IBDV kimutatásra és tipizálásra. 2004-ben 6 minta érkezett, a többi 247 a 2007-2008 között végzett - a Dél-afrikai Köztárság összes nagy baromfityényszto régióját lefedő -, felmérésből származott. A felmérésbe bevont állományok kora 19 és 47 nap között volt, nagyrészükből immunszuppresszióra utaló megbetegedéseket és termelés kiesést észleltek, de érkeztek minták egészséges állományokból is.

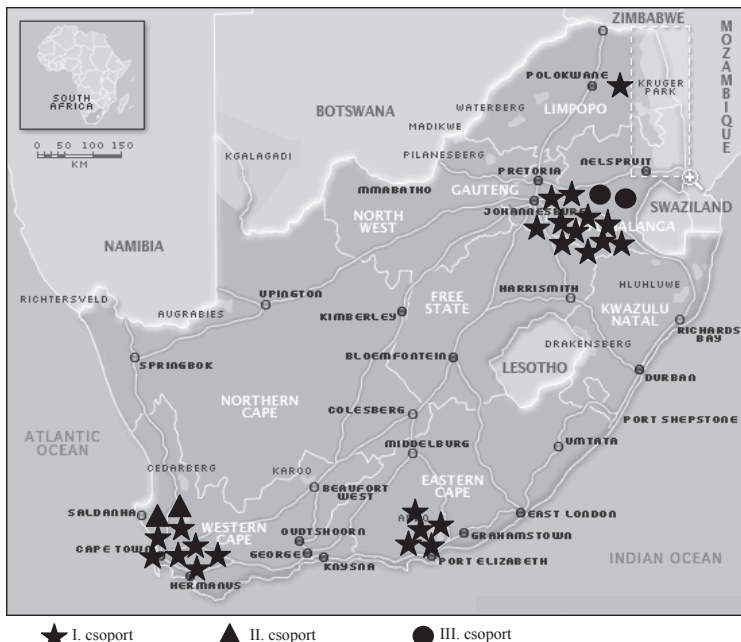
4.4.2 Filogenetikai eredmények

A 253 beküldött mintából 171 esetben sikerült a vírus nukleinsavát kimutatnunk PCR-rel. A PCR-pozitív minták szekvencia-analízise alapján nagyrészükből vakcina eredetű vagy nagyvirulenciájú törzs volt. Huszonhét esetben viszont a törzsek a többi dél-afrikai törzstől külön álló csoportot hoztak létre. Ez a csoport a filogenetikai fán az amerikai variáns vírusokkal alkotott közös csoportot, valamint származtatott aminosav szekvenciájukban megtalálhatók voltak a variáns vírusokra jellemző aminosavak is: így a 249. pozícióban lizin, a 286. pozícióban izoleucin és a 318. pozícióban aszparaginsav. A dolgozat további részében csak a variáns törzsekkel foglalkozunk. Huszonhét esetből, három 2004-ből, míg a többi

huszonnégy a 2007-2008-as felmérésből származott. A dél-afrikai variáns törzsek három jól elkülönülő csoportra oszlottak. Az I. csoportba sorolódott a törzsek nagy része, míg a II. és III. csoportba csupán két-két törzs került: a II. csoportba 2008-ból, a III. csoportba pedig 2007-ből (lásd 22. ábra).



Az I. csoport törzsei széles körben elterjedtek a Dél-afrikai Köztársaság fő baromfitartó régióiban, míg a II. csoport törzsei csak Western Cape tartományban, a III. csoport törzsei pedig csak Mpumalanga tartományban voltak megtalálhatók (23. ábra).



23. ábra A Dél-afrikai Köztársaságból izolált variáns IBDV izolátumok származási helye a genetikai vizsgálat alapján végzett csoportosításnak megfelelően jelölve.

Az I. csoportban, a 2004-ben izolált törzsek közül kettő (D430/3 és D430/5) aminosav szekvenciája a vizsgált régió megegyezett, míg a harmadik (D430/4) egy leucinban különbözött tőlük a 326. pozícióban, ami a szerin-gazdag heptapeptid régióiban található. Az I. csoport 2007-2008 között izolált törzseinek az aminosav szekvenciája azonos volt és a 242. pozícióban egy valin aminosavban különböztek a D430/3 törzstől. Az I. csoportba tartozó törzsek közötti nukleotid hasonlóság 98-100% között változott. A II. csoportba tartozó két izolátum nukleotid szekvenciája egymással azonos volt és D430/3 törzstől tizenhat nukleotidban különböztek, amelyek közül csak három okozott aminosav különbséget is. Szerin helyett aszparagin van a 254. pozícióban (ami a P_{DE} hurok területén található), aszparaginsav helyett glutaminsav a 300. pozícióban és leucin helyett szerin a 328. pozícióban (ami a szerin-gazdag heptapeptidben található). Az I. és a II. csoport közötti hasonlóság 95-

96% volt. A III. csoportba tartozó két izolátum nukleotid szekvenciája egymással és a Delaware E (DeE) amerikai variáns referencia törzsszel megegyezett.

	P _{BC}					P _{DE}					P _{FG}					P _{HI}				
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340		210	220	230	240	250
TAADNYQ	S	SVYTG	GGT	ITITL	FSAN	DAIT	LSL	SVGGEL	IKTS	VSQ	SL	VLGAT	TYL	IGFG	TA	VITR	VA	ANNG	TAC	IG
De1E/85US
D862/3/072A
D862/22/072A
05SA8/0/052A
D430/4/042A
D430/3/042A
05SA8/052A
03-59467/CA
06-45600/CA
D1054/85/2A
VaxA/85US
UR661/86GB
D76
52/70GB
STC/67US
00273/73AU

24. ábra Dél-afrikai és kanadai variáns IBDV törzsek aminosav szekvenciájának összehasonlítása a DeE referens variáns törzsszel.

A pontok a DeE törzsszel megegyező aminosavakat jelölik, a vonalak a törzs szekvenciájából hiányzó aminosavakat. A fő hidrofíl régiók aminosavait keretek jelölik. A szerin gazdag heptapeptid aláhúzás jelöli.

Az I. csoport törzseinek aminosav szekvenciáját összehasonlítva a Delaware E referens törzsszel öt aminosav különbséget állapítottunk meg. A P_{BC} hurok területén a 222. pozícióban treonin helyett alanin, a 300. pozícióban glutaminsav helyett aszparaginsav, a P_{HI} hurok területén a 320. pozícióban glutamin helyett treonin és szintén ezen a hurkon a 323. pozícióban glutaminsav helyett aszparaginsav, továbbá a szerin-gazdag heptapeptidben a 328. pozícióban szerin helyett leucin található. Egy további aminosav változást észleltünk az I. csoportba tartozó összes, 2007-2008 között izolált törzs esetében: a 242. pozícióban valin helyett izoleucin található (lásd 24. ábra). A II. csoportba tartozó törzsek négy aminosavban különböznek a Delaware E törzstől. Ebből három megegyezik az I. csoport esetében találtakkal: 222. alanin, 320. treonin és 323. aszparaginsav, ezek mind vagy P_{BC} hurok, vagy pedig a P_{HI} hurok területén helyezkednek el. A negyedik aminosav különbség, amely jellemző e csoportra a P_{DE} hurok területén lévő 254. pozícióban szerin helyett aszparagin.

Két dél-afrikai törzs (05SA8, 05SA10), amelyeket *Jackwood* és munkatársai (2007) írtak le 2005-ből, továbbá kanadai variáns IBDV izolátumok egy csoportja (05SA8 csoport), amelyeket *Ojic* és munkatársai (2007) írtak le 2003-2006 közötti időszakból, az általunk kimutatott dél-afrikai variáns IBD vírusok I. csoportjával mutattak legközelebbi rokonságot. Az általunk II. csoportba sorolt dél-afrikai törzsek a legközelebbi rokonságot a 06-45600 jelű kanadai törzsszel (99,5%) és a 2001-2006 között szintén Kanadában izolált variáns törzsek egy másik csoportjával (NC171) mutatták (22. ábra, 48. oldal).

4.4.3 2004-ben, Dél-Afrikában izolált IBDV törzs virulenciájának vizsgálata csirkében

A fertőzési kísérletben felhasznált húshibrid (broiler) csirkékben közepes maternális ellenanyagszintet mértünk (fertőzéskor, azaz 3 napos korukban \log_2 VN titer: $12,26 \pm 0,97$). A többi eredményt összefoglalva a 2. táblázat tartalmazza.

Mintavétel időpontja (nap p.i.)	Csoport	Vírus törzs	EREDMÉNYEK					
			Broilerek			Szentinelék		
			PCR	Kórszövetten	B:B index		Kórszövetten	B:B index
					átlag \pm STD	min.	(egyedi adatok)	
6	1	varSA	+	+ ^a	0,80 \pm 0,23	0,53	+ ^a	0,39; 0,63
	2	DelE	+	+ ^a	0,61 \pm 0,41	0,22	+ ^a	0,27; 0,43
	3	2512	-	-	0,94 \pm 0,36	0,53	NV	NV
	4	-(kont.)	NV	-	1,00 \pm 0,34	0,66	NV	NV
14	1	varSA	NV	+ ^{kr}	0,43 \pm 0,26	0,15	+ ^{cr}	0,24; 0,29
	2	DelE	NV	+ ^{kr}	0,58 \pm 0,41	0,16	+ ^{cr}	0,19; 0,21
	3	2512	-	-	0,91 \pm 0,11	0,79	NV	NV
	4	-(kont.)	NV	-	1,00 \pm 0,17	0,83	NV	NV
21	1	varSA	+	+ ^{kr}	0,28 \pm 0,07	0,21	NV	NV
	2	DelE	+	+ ^{kr}	0,30 \pm 0,17	0,15	NV	NV
	3	2512	-	-	0,79 \pm 0,23	0,54	NV	NV
	4	-(kont.)	NV	-	1,00 \pm 0,13	0,73	NV	NV

2. táblázat Állatkísérlet eredményeinek összefoglalása

Rövidítések: *Vírus törzsek:* varSA - a D430/3 jelzésű dél-afrikai IBDV izolátum; DelE - Delaware E referens variáns IBDV törzs az Egyesült Államokból; 2512 – „klasszikus” antigenitását IBDV, Winterfield 2512 vakcina törzs; kont. - nem fertőzött kontrollok.

PCR eredmények: +: IBDV specifikus szekvencia kimutatása; -: IBDV specifikus szekvenciát nem tudtunk kimutatni, NV: nem vizsgáltuk.

Kórszövetten eredmények: + jelzi az IBDV által okozott kórszövetten elváltozások jelenlétét az alábbi kiegészítésekkel (a): akut elváltozások, (kr): krónikus elváltozások regenerálódásra utaló jelekkel, illetve regenerálódott bursák; - IBDV-re jellemző elváltozásoktól mentes bursát jelent; NV: nem vizsgáltuk.

B:B index: számtani átlag és szórás, valamint legkisebb érték szerepel a broilerek, míg a 2-2 vizsgált állat egyedi értéke szerepel a szentinel csirkék esetében.

A dél-afrikai izolátummal fertőzött csoportban -a fertőzést követő hatodik napon- az öt vizsgált állat közül kettőben szövettani vizsgálattal és PCR-rel is, valamint ezeken felül további egy állatból csak PCR-rel lehetett a vírus megeredését kimutatni (lásd 2. táblázat). A betegség ekkor még nagyon korai szakaszában volt, így a B:B index nem változott jelentősen, ugyanakkor a fertőzött csirkék már ürítették a vírust, amit a szentinel SPF csirkék bursájában szövettani vizsgálattal már látható, IBD-re jellemző elváltozások és az alacsony B:B index is jelzett. Hasonló eredményeket kaptunk a Delaware E törzzsel fertőzött csoportban is. Két broiler csirkében eredt meg a ráfertőző vírus a fertőzést követő 6. napra, amit a kórszövetten elváltozások, az alacsony B:B index (0,22 és 0,29), valamint a vírus kimutatása PCR-rel egyaránt igazolt. A Delaware E törzs is áterjedt a szentinel csirkékre, a kórszövetten

elváltozások, az alacsony B:B index (0,27 és 0,43) és a PCR vizsgálat eredménye alapján egyaránt. A „klasszikus” antigenitású intermedier plusz vakcina megeredését egyik alkalmazott vizsgálati módszerrel sem tudtuk kimutatni, sem a 6. sem pedig a 14. és 21. napon vakcinázást követően vett mintákból. Mivel a húshibridekben nem eredt meg a vakcina, így a velük együtt tartott szintinel csirkék vizsgálatát ebben a csoportban nem végeztük el.

A variáns törzsekkel fertőzött csoportokban a bursa elváltozások kórfejlődését a fertőzést követő (p.i.) 6., 14. és 21. napon a B:B index, valamint a kórszövettani elváltozások alapján követtük nyomon. A fertőzés hatására egyik csoportban sem jelentkeztek klinikai tünetek, illetve elhullások (sem a húshibrid, sem a betegségre érzékenyebb SPF tojóhibrid csirkék esetében).

Az B:B index átlagaként a dél-afrikai, illetve a Delaware E törzssel fertőzött húshibridekben 0,80 illetve 0,61 értéket mértünk a 6. napon (p.i.), 0,43-at illetve 0,58-at találtunk a 14. napon (p.i.), ami tovább csökkent (0,28 illetve 0,30) a 21. napra (p.i., ld. 2. táblázat). A két csoport közti különbség egyik időpontban sem volt szignifikáns. A talált kórszövettani elváltozások megegyeztek a variáns törzsekre jellemző kórképpel (*Sharma és mtsi, 1989*). A fertőzést követő 6. napon a dél-afrikai izolátummal fertőzött csoportban limfocita kiürüléssel (follikulusok 30%-ában), karyorrhexissal és elvétve heterofil granulocita beszűrődéssel jellemezhető, heveny elváltozásokat láttunk, jelentős gyulladás nélkül. A Delaware E csoportban a 6. napra már előrehaladottabb kórkép alakult ki. A follikulusokban limfocita kiürülést és vakuolizációt találtunk, valamint mononukleáris-sejtes beszűrődést a follikulusok közti kötőszövetes sővényben. A fertőzést követő 14. napra mindkét csoportban az összes follikulust érintő, idült elváltozások alakultak ki (follikulusokban limfocita deplécio, retikulumsejt felszaporodás, néhány esetben vakuolizáció, valamint intrafollikuláris ciszták és regenerációs hámsejt-szigetek). A 21. napon előrehaladottabb idült elváltozásokat találtunk (továbbra is volt néhány intrafollikuláris ciszta, de a follikulusok közti kötőszövet megszaporodása szembeötlőbbé vált), ami mellett a regenerálódás jeleként számos follikulusban megkezdődött a lymphocyták újratelepülése. A tojóhibrid SPF csirkékben a kórfejlődés gyorsabb volt, már a 6. napra igen súlyos limfocita deplécio alakult ki, amit a nagyon alacsony B:B index is jelzett (0,24-0,39 a dél-afrikai, valamint 0,17 és 0,27 a Delaware E csoportban).

4.5 A kereskedelmi forgalomban kapható IBDV vakcinatörzsek összehasonlítása

4.5.1 Vizsgált vakcinák

A világ számos országából - Malajziától Magyarországon keresztül Brazíliáig - 27 gyártó 48 kereskedelmi forgalomban kapható vakcináját hasonlítottuk össze. A vizsgálatokat minden esetben bontatlan gyári ampullákból végeztük. Minden vakcina estében igyekeztünk megtudni a vakcinatörzs megnevezését és annak a gyártó által megadott virulenciáját (3. táblázat.)

Vakcina neve	Gyártó	Vakcinatörzs	Virulencia	Besorolás
Bursa Blen	MERIAL	WG87/ 2512	Mild	D78-csoport
CEVAC Bursa L	CEVA	G87	Mild	D78-csoport
Gallivac IBD	MERIAL	S706	Intermediér	D78-csoport
Gumboro	OVEJERO	2512	Intermediér	D78-csoport
Gumbovac Plus	ISBI	S706	Intermediér	D78-csoport
Izovac Gumboro 2	IZO	2512	Intermediér	D78-csoport
Izovac Gumboro 3	IZO	2512/90	Intermediér plusz	D78-csoport
Nobilis Gumboro D78	INTERVET	D78	Intermediér	D78-csoport
Bur-706	MERIAL	S706	Intermediér	D78-csoport
TAD Gumboro Vac	LOHMANN	n.a.	n.a.	D78-csoport
TAD Gumboro	TAD	n.a.	n.a.	D78-csoport
Poulvac	SOLVAY	n.a.	n.a.	D78-csoport
Gumbokal IM Forte SPF	PFIZER	n.a.	n.a.	D78-csoport
Gumboral CT	MERIAL	Lukert	Intermediér	D78-csoport
Delvax 228TC	Advance Pharma (INTERVET)	228TC	Intermediér	P2-csoport
Gumbovac	IVAZ	W2512	n.a.	P2-csoport
Hipragumboro	HIPRA	W2512	Intermediér	P2-csoport
CEVAC Gumbo L	CEVA	LIBDV	Intermediér	P2-csoport
Univax-BD	SCHERING-PLOUGH	ST-12	Mild / Intermediér	P2-csoport
Gumbor Vet	BIOVET	GBV8	Intermediér	P2-csoport
Hipragumboro CH/80	HIPRA	CH-80	Intermediér	P2-csoport
TAD Gumboro vac forte	LOHMANN	LC-75	Intermediér plusz	P2-csoport
Bursa-Vac 3	SCHERING-PLOUGH	n.a.	Intermediér	P2-csoport
Gumboro In	CNN	n.a.	n.a.	P2-csoport
Avimmune I	COOPERS	G606/ Moulthrop	Intermediér / Mild	P2-csoport
Nobilis Gumboro 228E	INTERVET	228E	Kevéssé attenuált intermediér	228E-csoport
Hipragumboro GM97	HIPRA	GM97	Specifikus	228E-csoport
CEVAC IBD L	CEVA	2512	Intermediér plusz	2512-csoport
Gallivac IBD H2512	MERIAL	H2512	Intermediér plusz	2512-csoport
IBD Blen	MERIAL	2512	Intermediér plusz	2512-csoport
CNN-G22	CNN	n.a.	n.a.	2512-csoport
AviPro IBD Xtreme	LOHMANN	V217	Intermediér Plus	2512-csoport
Bursa-Vac	SCHERING-PLOUGH	G603	Hot	STC-csoport
Avimmune F	COOPERS	G603	Intermediér / Intermediér Plusz	STC-csoport

3. táblázat: A vizsgált vakcinák gyártói, valamint a vakcinatörzseiről a gyártó által közölt adatok és az általunk genetikai alapon végzett csoportosítás eredménye.

n.a.: nem ismert, virulencia: mild→erősen attenuált, intermediér→közepesen attenuált, intermediér plusz→gyengén attenuált, hot→nagyon gyengén attenuált

Vakcina neve	Gyártó	Vakcinatörzs	Virulencia	Besorolás
BG	All Russian Institute Of Animal Health	BG	n.a.	MB-csoport
IBD vaccine	VENTRI	n.a.	Intermediar	MB-csoport
IBD vaccine IV95	INDOVAX	IV95	Invazív intermediar	MB-csoport
MB	ABIC	MB	Intermediar	MB-csoport
Winterfield 2512	All Russian Institute Of Animal Health	W2512	n.a.	MB-csoport
Avivac IBB-M	NPP Avivac	W2512	Intermediar	MB-csoport
IBD vaccine IBD UPM93	Malaysian Vaccines & Pharmaceuticals (MVP)	UPM93	n.a.	vv IBDV
Bursimune	BIOMUNE	Lukert	Intermediar	Lukert-csoport
Poulvac Bursine 2	FORT DODGE	Lukert	Intermediar	Lukert-csoport
Bursi-Vac Kemia	KEMIA	Lukert	n.a	Lukert-csoport
Bursamune in ovo	FORT DODGE	n.a	Intermediar Plusz immunkomplex	V877-csoport
Poulvac Bursa F	FORT DODGE	V877	Intermediar Plusz	V877-csoport
IBD vaccine V877	Malaysian Vaccines & Pharmaceuticals (MVP)	V877	n.a	V877-csoport
Poulvac Bursa Plus	FORT DODGE	V877	Intermediar Plusz	V877-csoport

3. táblázat (folyt.): Vizsgált vakcinák gyártói, valamint a vakcinatörzsről a gyártó által közölt adatok és az általunk genetikai alapon végzett csoportosítás eredménye.

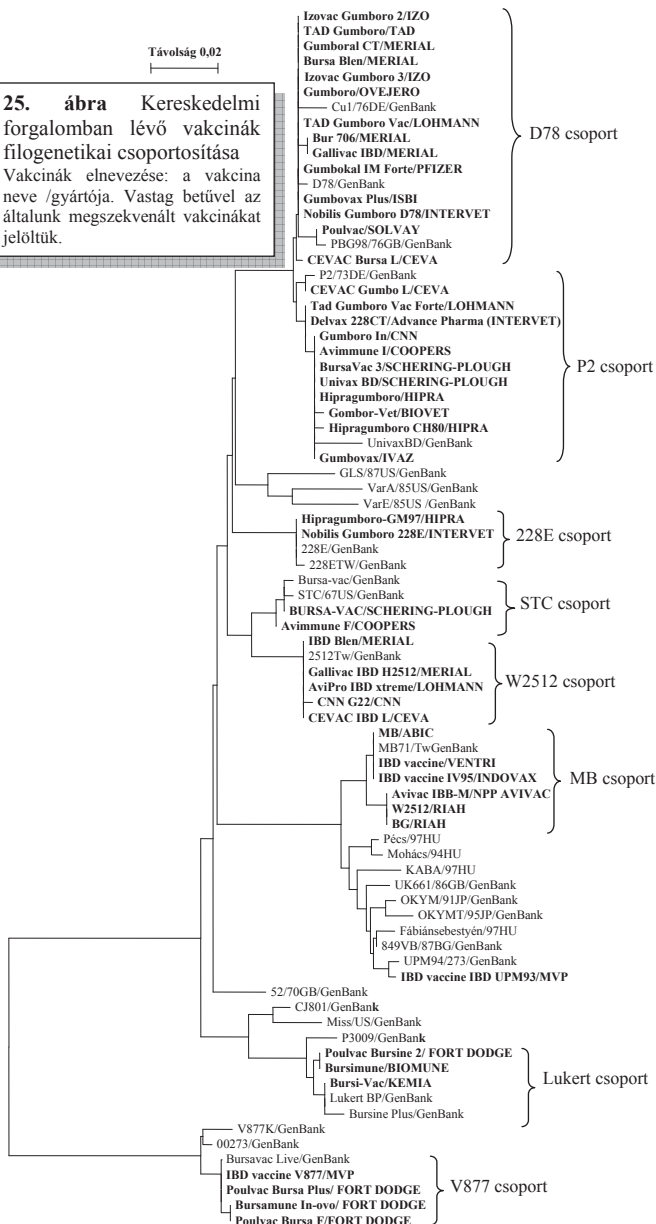
n.a.: nem ismert, virulencia: mild→erősen attenuált, intermediar→közepesen attenuált, intermediar plusz→gyengén attenuált, hot→nagyon gyengén attenuált

4.5.2 Filogenetikai eredmények

Az IBDV VP2 fehérjéjének hipervariábilis régióját kódoló nukleotid szekvencia alapján a vizsgált 48 vakcina 8 nagy csoportot alkotott. A csoportokat a bennük található legismertebb reprezentatív törzsről neveztük el (25. ábra, ld. következő oldal).

A sejtkulturához adaptált vakcinatörzsek két nagy, egymáshoz közel álló csoportot hoztak létre. A D78-csoportban 14 vakcina található, ezek közül 9 nukleotid szekvenciája megegyezett az általunk szekvenált *Nobilis Gumboro D78* vakcinatörzsszel. A GenBank-ból származó D78 szekvencia ettől egy nukleotidban eltért, ami aminosav változást nem eredményezett. Szintén egy-egy nukleotid különbséget találtunk a *Nobilis Gumboro D78* vakcinatörzs és három másik vakcina között. A *Bur 706* és a *Gallivac IBD* esetében ez a nukleotid változás egyben aminosav változást is eredményezett (a P_{BC} hurok területén a 223-as pozícióban glutamin helyett aszparaginsav lett), a *CEVAC Bursa L* esetében pedig a P_{DE} hurok területén a 249. pozícióban glutamin helyett található lizin. Két nukleotid különbséget találtunk a *Poulvac* esetében, amelyek mindegyike aminosav különbséget is eredményezett: a 249. pozícióban glutamin helyett arginin, míg a 280. pozícióban aszparagin helyett treonin található.

25. ábra Kereskedelmi forgalomban lévő vakcinák filogenetikai csoportosítása
Vakcinák elnevezése: a vakcina neve /gyártója. Vastag betűvel az általunk megszekenált vakcinákat jelöltük.



Az általunk vizsgált vakcinatörzsekön kívül két régi referens törzs is ebbe a csoportba került a GenBank-ból letöltött szekvenciája alapján. A PBG98 vakcinatörzs három aminosavban különbözött a *Nobilis Gumboro D78* vakcinatörzstől. A *Poulvac*-hoz hasonlóan a 249. pozícióban glutamin helyett arginin, a 280. aszparagin helyett treonin és ezeken kívül még a 326. pozícióban szerin helyett leucin található benne. A másik régi vakcinatörzs a Cu-1, ami két aminosavban különbözik a csoport névadójától: a 297. pozícióban prolin helyett szerin, míg a 330. pozícióban arginin helyett lizin található. A csoporton belül a törzsek egymáshoz viszonyított hasonlósága 100-98,6% között változik.

A ~~P2-csoport~~ba a vizsgált vakcinák közül 11 vakcina sorolódott. A P2 referens törzstől a *CEVAC Gumbo L* egy nukleotidban különbözik, ami a P_{DE} hurkon lévő 249. pozícióban aminosav különbséget is eredményez: itt arginin helyett glutamin található. Ez a nukleotid különbség megtalálható a csoport többi tagjában is. A *TAD Gumboro vac forte* és a *Delvax 228CT* ezen kívül még két további nukleotidban is különbözik a P2 törzstől. Ezek a nukleotid különbségek aminosav különbséget is eredményeztek: a 255. pozícióban izoleucin helyett leucin és a 290. pozícióban metionin helyett leucin. Ezek a nukleotid különbségek a csoport többi tagjában is megtalálhatók. További egy nukleotid különbséget észleltünk hat vakcina esetén, de ez aminosav különbséget nem eredményezett. Két vakcina esetében további egy-egy egyedi aminosav különbséget találtunk: a *Hipragumboro CH/80* vakcina esetében a 213. pozícióban aszparaginsav helyett glutamin, míg a *Gumbo-Vet* esetében a 334. pozícióban alanin helyett treonin található. Az általunk megszekvenált *Univax-BD* és a GenBank-ban található között öt nukleotid különbség volt, melyek közül kettő aminosav változást is eredményezett: a 265. pozícióban szerin helyett glutamin és a 278. pozícióban valin helyett alanin. A csoporton belüli nukleotid hasonlóság a GenBank-i *Univax-BD* szekvenciát figyelmen kívül hagyva 98,8%, azzal együtt 97,8%.

A ~~228E-csoport~~ba két vakcina tartozik az Intervet *Nobilis Gumboro 228E* vakcinája és a Hipra *Hipragumboro-GM97* vakcinája. Mindkét vakcina nukleotid szekvenciája megegyezik a GenBank-i 228E szekvenciával, míg a Tajvanról származó, szintén GenBank-i szekvencia esetében ezektől egy nukleotid eltérést tapasztaltunk, ami a 337-es pozícióban aminosav változást is eredményezett: izoleucin helyett treonin található a GenBanki GM97 törzsben.

A W2512-csoportba tartozó öt vakcinából négynek a nukleotid szekvenciája megegyezik a GenBank-ban található W2512-es szekvenciájával. Az egyedüli kivétel a *CNN G-22*-es vakcina, ami egy nukleotidban különbözik a csoport többi tagjától, ami a P_{III} hurok 317. pozíciójában szerin → arginin cserét eredményez. A csoporton belüli hasonlóság 100-99,8%.

Az STC-csoportban két vakcinatörzs található, melyek nagyon hasonlóak egymáshoz (99,5%). A *Bursa-Vac* és az *Avimune F* egy-egy nukleotidban különböznek az STC törzstől. Az *Avimune F* esetében ez a különbség aminosav változást is eredményezett a 279. pozícióban: itt aszparaginsav helyett aszparagin található. A *Bursa-Vac* esetében aminosav különbség nem volt kimutatható a klasszikus virulens STC törzshöz képest. A GenBank-i *Bursa-Vac* szekvencia egy nukleotidban különbözött az általunk megszekvenált *Bursa-Vac* vakcinától. Ez a nukleotid változás aminosav változást is eredményezett: a 248. pozícióban fenilalanin helyett leucin van.

Az MB-csoportot hat nagyvirulenciájú törzsből készített vakcina alkotja. A hatból három nukleinsav szekvenciája megegyezik a GenBank-ban található MB törzs szekvenciájával. A másik három vakcina nukleotid szekvenciája azonos és az MB törzstől három nukleotidban különbözik. Ez a három nukleotid különbség két esetben aminosav változást is eredményez: az egyik a P_{FG} hurok területén a 284. pozícióban alanin helyett treonin, a másik pedig a P_{HI} hurokon a 316. pozícióban lizin helyett arginin. Az MB csoportba tartozó törzsek hasonlósága 100-99,3%.

Egyik vakcinacsoportba sem sorolódik be egy maláj vakcina, az „*IBD vaccine IBD UPM93*”. Ez legszorosabb rokonságban egy szintén Malajziában izolált nagyvirulenciájú törzsszel, az UPM94/273-mal áll. Az *IBD UPM93* az UPM94/273-tól egy aminosavban különbözik: a 254. pozícióban szerin helyett a többi nagyvirulenciájú törzshöz hasonlóan glutamin található az *IBD UPM93*-ban. Szintén egy aminosavban különbözik a referens nagyvirulenciájú törzstől az UK661-től, ebben az esetben a 270. pozícióban alanin helyett glutaminsav található (az *IBD UPM93*-ban).

A Lukert-csoport három vakcinát tartalmaz. A *Bursi-Vac* nukleotid szekvenciája megegyezik a Lukert törzsszel. A *Bursine 2* és *Bursimune* vakcinák nukleotid szekvenciája egymással megegyezik és két nukleotidban eltér a Lukert törzstől, ami a P_{DE} hurok területén a 253. pozícióban glutamin helyett hisztidin és a 258. pozícióban aszparagin helyett aszparaginsav aminosav változást is előidéz. A GenBank-ból származó *Bursine Plus* vakcina nukleotid szekvenciája szintén két nukleotidban különbözik a Lukert törzstől és ezek mindegyike aminosav változást is előidéz, a P_{BC} hurkon található 222. pozícióban szerin helyett leucin és a P_{HI} hurkon található 317. pozícióban szerin helyett aszparagin. A Lukert csoporton belül a törzsek egymáshoz viszonyított hasonlósága 100-99%.

A V877-es csoportba négy vakcina sorolódott. A *Poulvac Bursa Plus* és a maláj „*IBD vaccine V877*” vakcinák nukleotid szekvenciája egymással és a GenBank-i „*Bursavac Live*” vakcinatörzs szekvenciájával megegyezik és hat nukleotidban különbözik az ausztrál

klasszikus virulens törzsből származó V877/K vakcinatörzs GenBank-i szekvenciájától. A hat nukleotid különbség közül csupán egy okoz aminosav változást: a 261. pozícióban valin helyett izoleucin található. A *Poulvac Bursa F* és a *Bursamune In-ovo* vakcinatörzsek nukleotid szekvenciája azonos és öt nukleotidban különbözik a V877/K vakcinatörzstől, de egyik nukleotid különbség sem okoz aminosav változást, így e vakcinák aminosav szekvenciája a V877/K vakcinatörzsével megegyezik. A V877 csoporton belül a törzsek közötti hasonlóság 100-98,5%.

D78 csoport	222	223	249	<u>253</u>	270	<u>279</u>	280	<u>284</u>	297	326	<u>330</u>		
Nobilis Gumboro D78	P	G	Q	H	T	N	N	T	P	S	R		
Bur 706		D											
Poulvac			R				T						
PBG98			R				T			L			
CEVAC Bursa L			K										
Cu1									S		K		
P2 csoport	213	222	249	<u>253</u>	255	265	270	277	<u>279</u>	<u>284</u>	290	<u>330</u>	334
P2	D	P	R	H	I	G	A	A	N	T	M	R	A
CEVAC Gumbo L			Q		I						M		
TAD Gumboro Vac Forte			Q		L						L		
Univax-BD			Q		L						L		
Univax-BD/GenBank			Q		L	S		V			L		
Hipragumboro CH/80	G		Q		L						L		
Gumboro Vet			Q		L						L		T
228E csoport	222	<u>253</u>		256	270	<u>279</u>		<u>284</u>	329		<u>330</u>		337
Nobilis Gumboro 228E	S	Q		I	T	N		A	V		S		I
228E/TW													T

4. táblázat Különböző vakcinacsoportok tagjainak csoporton belüli aminosav különbségei a csoport névadó törzséhez képest.

Csak a referens törzsektől különböző törzseket tüntettük fel. Aláhúzással jelöltük az antigenításban, vagy a sejtkultúra-adaptálásban fontos aminosavakat.

2512 csoport	217	222	<u>253</u>	270	<u>279</u>	<u>284</u>	294	<u>330</u>	317				
2512/TW	L	P	Q	T	D	A	I	S	S				
CNN-G22									R				
STC csoport	222	248	<u>253</u>	263	270	<u>279</u>	<u>284</u>	330	312				
STC	P	F	Q	F	T	D	A	S	V				
Bursa-Vac/GenBank		L											
Avimmune-F						N							
MB csoport	<u>222</u>	242	253	<u>256</u>	270	272	279	284	<u>294</u>	<u>299</u>			
MB	A	I	Q	I	A	T	N	A	I	S			
BG								T					
Lukert csoport	222	242	249	<u>253</u>	256	258	270	278	<u>279</u>	<u>284</u>	286	317	
LukertBP/GenBank	S	I	H	Q	A	N	A	S	D	T	I	S	
Bursine Plus												N	
Poulvac Bursine 2				H		D							
V877 csoport	222	<u>253</u>	258	261	264	270	272	<u>279</u>	<u>284</u>	299	305	328	332
V877K/GenBank	P	Q	N	V	V	T	T	G	A	S	V	L	N
Poluvac Bursa Plus				I									

4. táblázat (folyt.) Különbözővakcina csoportok tagjainak csoporton belüli aminosav különbségei a csoport névadó törzséhez képest.

Csak a referens törzsektől különböző törzseket tüntettük fel. Aláhúzással jelöltük az antigenításban, vagy a sejtkultúra-adaptálódásban fontos aminosavakat.

A csoportokra jellemző aminosavakat az 5. táblázatban foglaljuk össze.

Csoport neve	217	222	223	242	249	253	256	258	263	264	270	272	278	279	284	286	290	294	299	305	312	315	328	329	330	332
D78	S	P	(D) ¹	V	Q (R) ² (K) ³	H	V	G	L	I	T	I	A	N	T	T	M	L	N	I	I	S	S	S	R (K) ⁴	S
P2		P			H						A			N	T		L (M) ⁵								R	
228E		S			Q	I					T			N	A									V	S	
2512	L	P			Q						T			D	A			I								
STC		P			Q				F		T			D (N) ⁶	A						V					
MB		A		I	Q	I					A	T		N	A (T) ⁷			I	S					(R) ⁷		
Lukert		S (L) ⁸		I	H	Q (H) ⁹	A	N (D) ⁹			T		S	D	T	I										
V877		P			Q		N			V	T	T		G	A				S	V			L		N	

5. táblázat Különböző vakcinacsoportok jellemző aminosavai.

Zárójelben a csoport többségétől eltérő aminosav. Szürke háttérrel a hidrofíl régiókat jelöltük. Vastag betűvel a csoportra jellemző aminosavakat emeltük ki.

Zárójelben a csak bizonyos vakcinákra jellemző aminosavak szerepelnek az alábbi indexeknek megfelelően:

¹Bur 706, ²PBG98, ³Bursa L, ⁴Cu-1, ⁵CEVAC IBD L, ⁶Avimmune F, ⁷BG, ⁸Poulvac Bursine Plus,

⁹Bursimune/ Poulvac Bursine 2.

4.5.3 A különböző vakcinacsoportok sejt kultúra-adaptáltságának vizsgálata

A sejtenyészethez való adaptálódás vizsgálata céljából csirkeembrió-fibroblaszt sejtenyésztetre oltott vakcinák közül a D78, P2 és Lukert-csoportba tartozó két-két vizsgált vakcina a fertőzést követő harmadik napra a sejtenyészetben citopatogén hatást okozott. Az STC-csoport és a V877-csoport vakcinái a megfigyelési idő végéig nem okoztak citopatogén hatást. Meglepetésünkre a 228E-csoportból leoltott vakcina és az MB-csoport két vakcinája szintén okozott citopatogén hatást. Ezeknek a sejtenyészetben felszaporított törzseknek nukleotid szekvenciáit meghatároztuk (a VP2 hipervariábilis régióját kódoló szakaszt), majd összehasonlítottuk az ampullában található vakcinavírusok nukleotid szekvenciájával. A szekvencia-analízis eredménye szerint mindhárom esetben a P_{DE} hurkon található, 253. pozícióban lévő glutamin hisztidinre cserélődött. A *Nobilis Gumboro* 228E és az *MB vakcina* esetében ezen felül a P_{FG} hurkon található, 284. pozícióban lévő alanin treoninra változott. A BG vakcinatörzs esetében ez utóbbi változás már eleve, az ampullában lévő vírusban is jelen volt. A Lukert-csoport vakcinái közül a *Bursa Vac* vakcina esetében is csak mérsékelt

szaporodást vártunk a szekvencia ismeretében (sejttenyészet-adaptáltsági markerekből csak 284. treonin van benne), ezzel szemben ez a törzs a teljes sejttenyészetre kiterjedő, erős citopatogén hatást fejtett ki. A szöveti felülúszóból nyert vírustörzs szekvenciája a kiindulási törzshöz képest két nukleotidban különbözött, amelyek egyben aminosav különbséget is előidézték: a 253. pozícióban glutamin helyett hisztidin és a 258. pozícióban aszparagin helyett aszparaginsav volt megtalálható.

4.5.4 Sejtkultúra-adaptált vakcinák természetes körülmények között revertálódott változatainak vizsgálata

2000-ben nagyüzemi vakcina kipróbálás során egy elkülönített állattartó-telepen a húshibrid, nem vakcinázott kontroll állatokban a kísérleti mintavétel során kórbonctanilag középsúlyos bursitist (kicsi, sárgás, ödémás, enyhén gyulladt bursa) találtunk. A vírus a fertőződött állatokban klinikai tüneteket és elhullást nem okozott. A vírus molekuláris biológiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy a törzs a P2 vakcinacsoportba tartozó *CEVAC Gumbo L* vakcina törzsének egy revertálódott változata. Az általunk vizsgált génszakaszon ugyanis csak egy nukleotid eltérést találtunk az eredeti vakcinatörzshöz képest, ami a 253. pozícióban aminosav változást eredményezett. A sejtkultúra-adaptált eredeti vakcinatörzsben ebben a pozícióban hisztidin található, míg a revertálódott törzsben ez glutaminra változott. A kórszövettani vizsgálat kimutatta, hogy a revertálódott vírus az eredeti vakcinatörzshöz képest súlyosabb elváltozásokat okozott a bursában.

2008-ban egy másik baromfi-nevelőtelepen szintén vakcina kipróbálási kísérlet során *Nobilis Gumboro D78*-cal vakcinázott húshibridekben a mintavétel során a vakcinától várhatóan súlyosabb elváltozásokat tapasztaltunk. A molekuláris biológiai vizsgálat során az előző esetből származó törzsszel megegyező, revertálódott *CEVAC Gumbo L* vakcinatörzset találtunk. Ez esetben is csak a 253-as hisztidin változott glutaminra. A D78 vakcinatörzset nem találtuk meg a vizsgált állatokban. A kórszövettani és kórbonctani vizsgálatok szintén az eredeti vakcina törzsénél súlyosabb elváltozásokat mutattak ki. A vírus ebben az esetben sem, okozott sem klinikai tünetet, sem pedig elhullást.

Szintén 2008-ban egy kontrollált körülmények között (izolátorokban) végzett kísérlet során a *Nobilis Gumboro D78*-cal vakcinázott állatok közül néhányban a vakcinától elvárhatóhoz képest erősebb bursa elváltozásokat észleltünk. A kórbonctani és kórszövettani elváltozások súlyossága megegyezett a revertálódott *CEVAC Gumbo L* vírus esetében tapasztaltakkal. Az ilyen állatokból származó bursák mindegyikében az eredeti vakcinavírustól (D78) egy

nukleotidban különböző vírustörzset találtunk. Ez a nukleotid különbség aminosav változást is okozott a 253-as hisztidin esetében, ami glutaminra változott.

A revertálódás reprodukálása érdekében a *CEVAC Gumbo L* vakcinával embrionált SPF tojást oltottunk, ott a vírust elszaporítottuk, majd az így kapott vírusszuspenziót továbboltottuk újabb SPF tojásba. A műveletet még négyszer megismételtük, majd az így nyert vírus szekvenciáját vizsgáltuk. Az ötször passzált vírus szekvenciája csak egy nukleotidban tért el a kiindulási vakcinavírusétól, ami a 253. pozícióban -a természetes körülmények között revertálódott vakcina törzsekhez hasonlóan-, hisztidin helyett glutamint eredményezett. Ezzel a törzzsel négy hetes korú SPF csirkét fertőzve, a természetes körülmények között revertálódott törzsekhez hasonlóan, az eredeti vakcinatörzshöz képest súlyosabb kórbonctani és kórszöveti elváltozásokat észleltünk. Klinikai tüneteket és elhullást ebben az esetben sem tapasztaltunk.

Ezt a revertálódott törzset CEF sejtenyészeten ötször megpasszáva az eredeti vakcinatörzshöz jellemző szekvenciájú törzset kaptunk. Azaz a 253. pozícióban hisztidint találtunk.

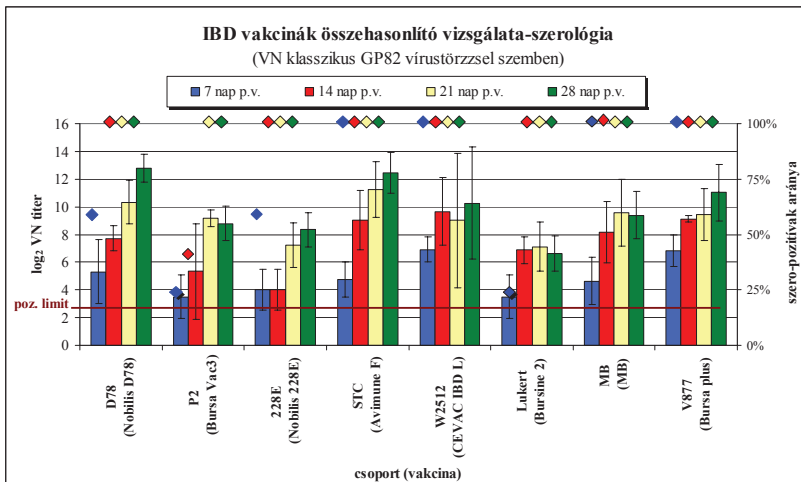
4.5.5 A különböző vakcinacsoportok összehasonlítása SPF csirkében

Szerológia:

Mindegyik vizsgált vakcina már az immunizálást követő 7. npra mérhető humorális immunválaszt indukált, de csak az STC-, a W2512-, az MB- és a V877-csoport esetében bizonyult minden mintázott állat pozitívnak. A D78- és 228E-csoportokban 60%-os, míg a P2- és a Lukert-csoportokban csak 20%-os volt az áthangelódott állatok aránya a vírusneutralizációs vizsgálat eredménye alapján (VN). A vakcinázást követő 14. napon már csak a P2-csoportban találtunk negatív csirkéket (40%-os szero-pozitivitás), az összes többi csoport minden állatában kimutatható volt az IBDV-vel szemben termelődött ellenanyagok jelenléte. Az ELISA vizsgálat eredménye összhangban volt a vírusneutralizációs vizsgálattal, csupán a 228E-csoport esetében találtunk eltérést, ahol a VN eredményekkel ellentétben már a 7. napon minden állat pozitív volt (magas ELISA titert mértünk minden állatban).

A D78-, 228E-, STC- és V877-csoportokban az átlag VN titer a 28. napig folyamatosan nőtt, míg a P2-csoportban a 21., a W2512-, Lukert- és MB-csoportokban pedig már a 14. npra elérte a platót. A D78-csoportoz tartozó neutralizáló vírussal (GP82) mérve különbséget találtunk az egyes csoportokban elért ellenanyagszintben. Ez az eltérés különösen szembeötlő a P2-, 228E- és Lukert-csoport esetében, de az MB törzsnél is -kisebb mértékben ugyan-, a többi csoportoz képest alacsony titert mértünk. A W2512-csoportban nagyon nagy szórászt tapasztaltunk az utolsó 3 mintavételi időpontban, így ezt a csoportot az elért ellenanyagszint

alapján ebből a vizsgálatból nem tudtuk jellemezni. A V877-csoport az alacsonyabb titerrel jellemezhető csoportok és a D78&STC-csoport között helyezkedik el.



26. ábra: Különböző IBDV vakcinákkal immunizált csoportokban kialakuló humorális immunválasz.

Az oszlopok a különböző mintavételi időpontokra jellemző átlag log₂VN titeret mutatják, jelölve a szórásokat is. Az oszlopokkal megegyező színű rombuszok az áthangolódott csirkék arányát jelzik mintavételi időpontonként. A szero-pozitivitás határát minimum 1:10 VN titerben határoztuk meg.

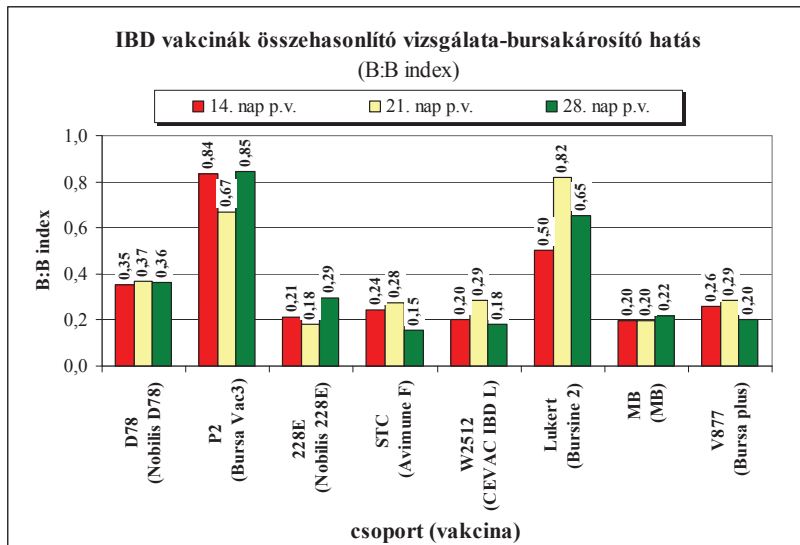
Vakcinavírus kimutatása, azonosítása:

Mindegyik vakcinázott csoport esetében legalább 1 mintavételi időpontban (Bursa Vac3 esetében csak 14. napon, többi vakcina esetében 7., 14., 28. napon is, kivéve D78-at, ami 7. napon még negatív volt, valamint W2512-, MB- és V877-csoportot, ami 28. napon már negatív volt) kimutattuk a vakcinavírust az immunizált állatok bursa dörzsölékéből.

Bursakárosító hatás:

A bursakárosító hatás jellemzésére a B:B indexet használtuk. Enyhe bursakárosító hatást tapasztaltunk a P2- és a Lukert-csoport esetében („mild” vakcinák). Előbbi csoportban egyik mintavételi időpontban sem csökkent 0,6 alá a B:B index, míg utóbbi csoportban a 14. napon mért 0,5 érték a 21. napra 0,6 fölé emelkedett. Közepes szintű károsodást (kb. 0,35 B:B index) mértünk minden vizsgált időpontban a D78-csoport esetében („intermedier vakcina”). Az összes többi csoportban kifejezett bursa sorvadásra utaló, alacsony B:B értékeket találtunk (0,2-0,3 közötti, de az STC-csoport esetében 0,15 átlag B:B index is előfordult; „intermedier plusz” vakcinák). Sem az „intermedier”, sem az „intermedier plusz” vakcina törzsek által

okozott bursa elváltozás nem mutatott regenerálódására utaló jeleket a B:B index alapján a vizsgált időszakban.



27. ábra: Bursakárosodás mértéke (B:B index alapján) a különböző csoportba tartozó vakcinákkal immunizált csirkékben.

A vakcinák bursakárosító hatását az előidézett kórszöveti elváltozások alapján is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a P2- és a Lukert törzsek csak nagyon enyhe limfocita kiürülést (depléció), elsősorban 1-1 follikulusban vakuolizációt okoznak. A Lukert-csoportban a D14 napi mintavételnél találtunk két bursát, ahol a többihez mérten magas, 20, illetve 50 % volt az érintett follikulusok aránya. A D78-csoportban szintén a limfocita depléció volt a jellemző elváltozás, ez azonban több follikulust érintett. Gyakoribb volt a follikulusok vakuolizációja és az interfollikuláris kötőszövet megszélesedése is, továbbá több esetben találtunk intraepitheliális cisztákat is. A kifejezettebb bursakárosító hatású, intermedier plusz vakcinák esetében is a D78-csoportnál leírt limfocita kiürülés, follikulusok vakuolizációja, interfollikuláris kötőszövet megszaporodása és intraepitheliális ciszták jellemezték a bursa elváltozásokat. Érdekes módon, már a 7. napi mintavételnél sem találtuk nyomát jelentősebb gyulladásnak, a kórbonctani vizsgálat során is csak épnék látszó, illetve sorvadtnak láttunk, komolyabb gyulladásra utaló ödémát nem tapasztaltunk.

5. MEGBESZÉLÉS

Munkánk első lépése egy **diagnosztikai célra alkalmas, az IBD vírust szervmintákból közvetlenül kimutatni képes PCR módszer kidolgozása** volt. Erre két korábban publikált PCR rendszer összekombinálásával egy RT-t követő nested PCR rendszert dolgoztunk ki (*Lin és mtsi, 1993; Liu és mtsi, 1994*), ami a vírusgenom legváltozékonyabb részét, a VP2 gén hipervariábilis régióját amplifikálja, így a vírus kimutatásán túl különösen alkalmas az egyes törzsek elkülönítésére, illetve rokonsági viszonyaik feltérképezésére (RFLP, illetve szekvencia-analízis során). Az RT reakcióban a tisztított vírus RNS-t random primer segítségével írjuk át cDNS-é, annak érdekében, hogy ugyanazt a cDNS-t esetleg más diagnosztikai PCR reakcióban is fel lehessen használni. A nested PCR módszerre azért esett a választásunk, mert a két egymást követő PCR reakció az egyszeres PCR-nél legalább egy nagyságrenddel érzékenyebb. Az így felépített víruskimutatási módszer tapasztalataink alapján alkalmasnak bizonyult mind diagnosztikai víruskimutatásra, mind pedig a vírus szervezeten belüli terjedésének vizsgálatára. Ilyen vizsgálatot végeztünk *Iván Judittal* és munkatársaival (2005) együttműködve, ahol egy immunkomplex IBD vakcina vírusának kimutathatóságát vizsgáltuk a vakcinázást követő különböző időpontokban, különböző immunszervekben, az általunk kidolgozott módszert is felhasználva. A diagnosztikai módszer alkalmazhatóságának megítélése szempontjából elsősorban azt kell tudnunk, hogy mennyi vírusrészecskének kell lennie a vizsgálati mintában ahhoz, hogy abból pozitív PCR eredményt kapjunk (olyan mennyiségű PCR terméket, hogy annak RFLP vizsgálatát, illetve szekvenálását is el lehessen végezni). Ezért az érzékenységet az RNS tisztítás, reverz transzkripció és nested PCR együttes alkalmazására határoztunk meg, ismert titerű vírusszuspenzióból kiindulva. A módszer érzékenységét először egy sejtkultúra-adaptált vakcinavírus elszaporításával nyert, plakktitrálással meghatározott titerű vírusszuspenzió hígítási sorával vizsgáltuk. Az érzékenységre kapott $10^{2,8}$ PFU/vizsgálatba kerülő minta (200 μ l) eredmény a diagnosztikai vizsgálatokra elégségesnek bizonyult. Később, amikor már elegendő vírustörzs állt rendelkezésünkre, a főbb IBDV törzscsoportok képviselőivel is megismételtük az érzékenységi vizsgálatokat. Az eredmények alapján a víruskimutatási módszer érzékenysége - a BG nagyvirulenciájú törzset kivéve - nem tért el jelentősen a különböző törzscsoportok esetében ($10^{3,0}$ - $10^{3,1}$ EID₅₀/minta és $10^{3,6}$ - $10^{3,9}$ TCID₅₀/minta) feltételezve, hogy a három titrálási módszer mértékegységei nagyságrendileg azonos vírusrészmennyiséget takarnak. A BG - sejtkultúrához adaptált nagyvirulenciájú törzs - esetében a víruskimutatási módszer (RT-PCR) feltűnően nagy érzékenységet mutatott. A PCR-nek ezt a

magas érzékenységet a vírus gyengébb citopátozen hatásával magyarázhatjuk. (A BG törzs „B” szegmensének szekvenciáját nem ismerjük ugyan, de feltételezzük, hogy nem különbözik jelentősen a genetikailag és biológiailag hozzá nagyon közelálló MB törzs „B” szegmensétől, ami a nagyvirulenciájú törzsekével mutat szoros rokonságot.) Ugyan a vírus képes bejutni a nem-limfoid sejtenyészeten sejtjeibe, de a nagyvirulenciájú vírusokra jellemző „B” szegmens miatt valószínűleg nem képes magas titerben szaporodni bennük, ami a citopátozen hatás (CP hatás) elmaradásával járhat. Ezért a titrálás során a CP hatás alapján alacsonyabb vírustiter mérünk, mint az a mintában levő fertőzőképes vírionok számával arányos lenne. Ezt az elképzelést támasztja alá *Boot* és munkatársai (2000) által reassortáns IBD vírusokon végzett vizsgálat is. Sejtkultúrához adaptált klasszikus virulens törzs „B” szegmensét nagyvirulenciájú törzs „B” szegmensére cserélték, aminek eredményeképpen a vírus szaporodóképessége sejtenyészeten jelentősen csökkent.

Az IBD vírust tartalmazó, nagy mennyiségű diagnosztikai minta gyors szűrésére kidolgoztunk egy RFLP módszert, amivel (i) a sejtkultúrához adaptált vakcinatörzsek, (ii) a variáns törzsek nagy része, (iii) a klasszikus virulens törzsekből származó vakcinák, (iv) a szubklinikai törzsek és (v) az ausztrál klasszikus virulens törzsből készült vakcinák csoportjai elkülöníthetők egymástól, valamint a klasszikus virulens és nagyvirulenciájú törzsektől is. A klasszikus virulens törzsek szintén elkülöníthetők a nagyvirulenciájú törzsek nagy részétől, valamint a nagyvirulenciájú törzsekből készült vakcina törzsek a vad nagyvirulenciájú törzsektől. A mindennapi diagnosztikai munkában az RFLP analízis a vírus csoportok elkülönítésére csak megszorításokkal alkalmazható, a bevezetőben is említett problémák miatt. A restrikciós enzimek a vizsgálandó génszakasz mindössze pár százalékát képesek lefedni, a génszakasz további területein bekövetkező változások alkalmazásukkal nem mutathatók ki. Előfordulhat, hogy a vizsgált génszakaszon belül csak az enzimek felismerő helyein következik be változás, ami miatt az RFLP analízis alapján a vírus átsorolódik egy másik csoportba, ami a teljes génszakasz nukleotid szekvenciája alapján nem indokolt. Példaként említhetnénk az ecuadori variáns törzseket, amelyek *Ssp* I hasítási képe megegyezett a W2512 vakcina törzsével és csak újabb restrikciós enzim alkalmazásával lehetett őket a vakcinától elkülöníteni. Tapasztalataink szerint a restrikciós enzimekkel végzett törzstipizálás csak akkor használható, ha pontos háttér-információkkal rendelkezünk a mintáról (ismerjük, hogy az állományt, amiből a minta származik, milyen IBDV törzsszel vakcinázták, az adott országban milyen vad törzsek jelenlétére lehet számítani), valamint a restrikciós hasítási kép alapján kialakult csoportokból legalább csoportonként egy-egy

mintának a nukleotid szekvenciáját is meghatározzuk és már ismert virulenciájú referens törzsek nukleotid szekvenciájával összehasonlítjuk.

A vírustörzsek szekvenálását kétféleképpen lehet elvégezni. Vagy a PCR során felszaporított genomrészletet egy plazmidba beklónozzuk, majd a felszaporított klónból a plazmid univerzális primerei segítségével határozzuk meg a vizsgálandó genomrészlet szekvenciáját, vagy pedig a PCR terméket megtisztítjuk a primer maradékoktól és a PCR primerei segítségével közvetlenül a klónozási lépés beiktatása nélkül szekvenáljuk meg. Az IBD vírus törzsek esetében is, hasonlóan sok RNS vírushoz, a törzs több, egymástól néhány nukleotidban különböző vírus keveréke, ahol egy szekvencia variáns nagy többségben van, míg a többi csak néhány száz vírus részecskével képviselteti magát. Klónból történő szekvenálás esetén előfordulhat, hogy éppen a törzset nem jellemző, kisebbségben lévő szekvenciát sikerül beklónozni, így a szekvenálás során nem a törzsre jellemző, többségi vírus változat szekvenciáját kapjuk meg. Ennek elkerülése végett a szekvenálást minden esetben közvetlenül a PCR termékből végeztünk annak érdekében, hogy a kapott szekvencia a mintában lévő törzs jellemző, domináns szekvenciáját tükrözze. Az összehasonlítást részben génbanki szekvenciák, részben a több évi diagnosztikai munka során a világ számos országából származó és egyre bővülő saját törzsgyűjtemény felhasználásával végezzük. E törzsgyűjtemény több reprezentáns tagjának patogenitási vizsgálatát is elvégeztük.

A kidolgozott molekuláris diagnosztikai módszer segítségével számos, korábban még nem jellemzett törzs vizsgálatát végeztük el. Elsőként **Magyarországról származó törzseket, valamint azok lehetséges eredetét vizsgáltuk.** Az 1975-ben Magyarországon izolált első klinikai megbetegedést előidéző IBDV törzs megegyezett az Európában elsőként 1970-ben, az Egyesült Királyságban izolált 52/70 klasszikus virulens törzsszel. A szintén 1975-ben, Németországban izolált Cu-1wt törzs és az 52/70-es törzs aminosav szekvenciái a VP2 hipervariábilis régióján szintén megegyeznek (*Zierenberg és mtsi, 2001*). Ezek az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az európai klasszikus virulens törzsek egyetlen közös törzstől származnak. Ez a közös ős pedig, mivel az európai törzsek a klasszikus virulens törzsek közül az amerikai I. csoporttal (STC csoport) mutatnak szoros rokonságot (96,4-97,1%-os hasonlóság) valószínűleg egy, az ebbe a csoportba tartozó amerikai törzs lehetett. Ezzel szemben az 1980-ban, Kínában elsőként izolált klasszikus virulens CJ801 törzs az amerikai II. klasszikus virulens csoporttal mutat szoros rokonságot (98%-os hasonlóság). Ezek alapján valószínűnek tűnik, hogy a klasszikus virulens törzsek Amerikából nem egy, hanem több hullámban terjedtek szét a világ több országába.

Az 1977-1981 között Magyarországon és Lengyelországban szubklinikai esetekből izolált törzsek szoros genetikai kapcsolatban állnak egymással, és a többi genetikai csoporttól, így az európai klasszikus virulens törzsektől is jól elkülönülő csoportot alkotnak. Az elkülönülést jól mutatja a szubklinikai törzsek antigenitásbeli különbsége is a többi IBDV törzs csoporthoz képest, amit lengyel és francia kollégákkal közösen írtunk le (*Domanska és mtsi, 2004*). Ezt az antigenitásbeli különbséget részben a 222-es pozícióban lévő szerin okozhatja, mivel a kutatások szerint a 222-es pozíciónak kitüntetett szerepe van az ellenanyagok kötődéséért felelős epitópok kialakításában (*Letzel és mtsi, 2007*). Szerint ebben a pozícióban, eddig csak vakcina törzsekben (228E- és a Lukert-csoport vakcinái) találtunk, ami felveti annak lehetőségét, hogy ez az aminosav szerepet játszhat az attenuálódás folyamatában. A többi, a szubklinikai törzsekre jellemző aminosav egy része szintén szerepet játszhat az attenuálódásban. A 279-es pozícióban lévő aszparagin például a legtöbb csökkent virulenciájú törzsben jelen van. A prolin a másodlagos fehérje szerkezetekben lánctörést idéz elő, ezért a 289-es pozícióban lévő prolin, lévén, hogy meglehetősen közel helyezkedik el a P_{FG} hurokhoz, befolyásolhatja annak térszerkezetét és így közvetve a törzs virulenciáját is. 1981-óta sem Magyarországon, sem Lengyelországban, sem pedig más európai országban további szubklinikai IBDV törzseket nem sikerült izolálni. Ennek egyik lehetséges oka az lehet, hogy a klasszikus virulens törzsek fokozatosan kiszorították a már előzőleg régóta itt jelenlevő szubklinikai törzseket. A szubklinikai törzsek hosszabb ideig tartó Európai jelenlétét a magyar és lengyel szubklinikai törzsek között megmutatkozó nagyfokú divergencia (3,4%) is alátámasztja. Bár Európából eltűntek, a világ egyes tájain még ma is előfordulnak ebbe a csoportba tartozó vírusok. Erre utalnak a napjainkban Argentínában, Brazíliában, az USA-ban és Kanadában izolált szubklinikai törzsek is. Az ezekből az országokból leírt szubklinikai törzsek nagyfokú diverzitása (11,4%) szintén a törzscsoport hosszú evolúciós múltját bizonyítja. Érdekes, hogy a nagy időbeli és földrajzi távolság ellenére az argentin törzsek jelentősen hasonlítanak (96,1-98,4%) az európai törzsekhez.

A patogenitási vizsgálat eredménye alapján a P6 jelzésű szubklinikai törzs klinikai tünetekben, illetve elhullásban megnyilvánuló betegséget nem okozott (szubklinikai fertőződés), ugyanakkor a bursában a virulens Gumboro vírustörzsekre jellemzően alacsony B:B indexszel jellemezhető bursasorvadást idézett elő. A talált kórbonctani és kórszövettani elváltozások eltértek a klasszikus virulens IBDV törzsekre jellemzőktől abban, hogy a betegség korai szakaszában az esetenként vérzésekkel is kísért erős gyulladásos reakció a bursában nem volt megfigyelhető. Ezzel szemben a variáns törzsekhez hasonlóan a B-limfocitákban elszegényedett folliculusok, az interfollikuláris kötőszövet megszélesbedése

jelentette a jellemző kórszövettani elváltozásokat. Ezek a kórszövettani különbségek is alátámasztják, hogy a szubklinikai törzsek az IBD vírusok egy, a klasszikus törzsektől eltérő, ősi, újonnan felfedezett csoportját alkotják.

A szubklinikai IBDV törzsek nem-limfoid sejtenyészetben nem képesek szaporodni. Erre magyarázatot adhat a szekvencia-analízis eredménye: ezekben a törzsekben a 279. pozícióban lévő aszparaginon kívül nem található meg a sejt kultúra-adaptálódásban fontosnak tartott aminosavak, így a 253. pozícióban hisztidin és a 284. pozícióban treonin (Mundt, 1999, Lim és mtsi, 1999). Ez az eredmény alátámasztja azt a megfigyelést, mely szerint a 279. aszparagin önmagában pedig nem elegendő a vírus nem-limfoid sejtekbe való bejutásához (van Loon és mtsi, 2002). A szubklinikai törzsek csirkékben nem okoznak klinikai megbetegedést és elhullást sem. Ez a szubklinikai törzseknél tapasztalható alacsony virulencia felveti annak valószínűségét, hogy egy törzs alacsony virulenciáját nemcsak a limfoid sejtekben való gyenge szaporodó képessége magyarázhatja, hanem esetleg más aminosav változások, mint például a szubklinikai törzseken kívül a legtöbb csökkent virulenciájú törzsben is megtalálható 279. aszparagin. Továbbá okozhatja a többi klasszikus virulens-, variáns- valamint klasszikus virulens törzsekből sejt kultúrához adaptálással készített vakcina törzsektől jelentősen különböző „B” szegmens is, melynek szekvenciáját a két lengyel szubklinikai törzs esetében Le Nouën és munkatársai (2006) határozták meg.

Az 1995 és 2008 között izolált magyar törzsekről bebizonyosodott, hogy mindannyian a nagyvirulenciájú törzsek közé tartoznak. Az 1997-ben izolált törzsekkel a nagyvirulenciájú törzsekre jellemző klinikai tüneteket és kóronctani elváltozásokat sikerült reprodukálnunk 4 hetes SPF csirkékben. Az 1995-ben Magyarországon izolált törzs a nagyvirulenciájú törzsek magyarországi 1992-es megjelenését követően az első, amely esetében genetikai vizsgálattal is sikerült igazolni a nagyvirulenciájú törzsekhez való tartozását. A magyar izolátumok öt különálló csoportba sorolódása azt valószínűsíti, hogy Magyarországra a nagyvirulenciájú törzsek legalább öt egymástól független behurcolás során kerültek, amelyekből legalább három esetben meg tudtak telepedni és endemikussá váltak. A behurcolt törzsek lehetséges származási helyét nagyon nehéz megállapítani. A Jánoshalmán 2004-ben izolált törzs a nyugat-európai törzsekkel mutat szoros rokonságot, hasonlóan a tiszaszigeti izolátumhoz, ami a francia nagyvirulenciájú törzsekhez hasonlít a legjobban. A II. csoport törzsei román törzsekkel alkotnak közös csoportot, de ez a csoport közel áll egy kínai izolátumhoz is. A III. csoport törzsei pedig egy marokkói törzssel mutatnak szoros rokonságot.

A genetikai változékonyság és a patogenitásbeli különbségek molekuláris hátterének vizsgálatához a magyarországi és európai izolátumokból rendelkezünk különböző

virulenciájú „klasszikus” antigenitású (klasszikus virulens, nagyvirulenciájú és szubklinikai) törzsekkel, ugyanakkor a variáns törzscsoport vizsgálatához Európából nem állt rendelkezésünkre variáns IBDV törzs. A **Dél-afrikai Köztársaságból** 2004-ben érkezett mintákban az amerikai variáns IBD vírusokhoz nagyon hasonló vírusokat fedeztünk fel. Az eset érdekességét az adta, hogy az afrikai kontinensen antigén variáns vírusok jelenlétét addig még senki nem írta le. A vírusokat izoláltuk és állatkísérletekben vizsgáltuk patogénitásukat, valamint a vírusok antigénvariáns természetét, azaz azt, hogy az amerikai variáns vírusokhoz hasonlóan képesek-e áttörni a „klasszikus” antigenitású vírusok által kialakított maternális immunitást. Az állatkísérletekkel párhuzamosan részt vettünk 2007-2008-ban egy átfogó felmérésben, melynek során a Dél-afrikai Köztársaság legjelentősebb baromfitenyésztő területein elhelyezkedő, 247 különböző farmról kaptunk mintákat IBDV kimutatásra és tipizálásra. A 168 IBDV pozitív minta mintegy 15%-ban találtunk a 2004-es törzsekhez hasonló vírusokat. A törzsek filogenetikai vizsgálata során megállapítottuk, hogy a 2004-es törzsekkel együtt legalább három variáns genetikai csoport van jelen Dél-Afrikában. Kettő ezek közül a kanadai variáns IBDV törzsekkel alkot egy nagyobb monofiletikus csoportot. A legtöbb dél-afrikai törzs a 2004-es izolátumokkal egy csoportba (dél-afrikai I.) tartozik, amely nagyon szoros rokonságban áll a 05SA8 jelű kanadai csoporttal (*Ojkic és mtsi, 2007*). Ez a szoros rokonság azt valószínűsíti, hogy a variáns vírusokat Észak-Amerikából hurcolhatták be a Dél-afrikai Köztársaságba. Mivel 2004-re a dél-afrikai izolátumok valamelyest már különböztek egymástól, a behurcolás pár évvel 2004 előtt történhetett, majd ezt követően a törzsek divergáltak egymástól. Ezek az első variáns törzsek később endemikussá váltak Dél-Afrikában és a többi variáns törzstől függetlenül tovább evolvtak. Ezt támasztja alá a 242-es pozícióban lévő izoleucin, ami a 2007-2008 között izolált I. csoportba tartozó törzsek mindegyikében megtalálható, míg az ezt megelőző időszakból származó dél-afrikai izolátumokból és a hozzájuk közelálló kanadai törzsekből hiányzik. A II. csoportot alkotó két törzs még szorosabb rokonságban áll egy másik kanadai variáns csoport törzseivel (NC171) (*Ojkic és mtsi, 2007*). Ez a nagyon szoros rokonság a kanadai variáns törzsekhez egy újabb, az előzőtől független behurcolást valószínűsít néhány évvel ezelőtt. Az ebbe a két csoportba (I. és II.) tartozó összes törzs esetében a 222. pozícióban alanin található, amit eddig a nagyvirulenciájú törzsek jellemző aminosavának tartottak. Erre az aminosavra épül egy, a nagyvirulenciájú törzsek gyors kimutatására széles körben használt RFLP módszer is (*Zierenberg és mtsi, 2001*). Ez az eredmény is igazolja az RFLP módszer tárgyalásánál leírtakat, miszerint az RFLP analízis ellenőrző/megerősítő szekvenálások nélkül nem használható megbízhatóan IBDV törzsek tipizálására. A 222-es pozícióban lévő aminosav

megváltozása alaninra egy további fontos következménnyel is jár, mégpedig azzal, hogy a Delaware E referens variáns törzsre jellemző Mab 67 monoklonális ellenanyag már nem tud kötődni ezekhez a törzsekhez (*Letzel és mtsi, 2007*). Ez az eredmény valószínűsíti, hogy a dél-afrikai variáns IBDV törzsek antigenitásban is különbözhetnek a Delaware E referens variáns törzstől. *Brandt és munkatársai (2001)* által végzett vizsgálatok szerint a 222. pozícióban treonin vagy glutamin, a 249 pozícióban lizin és a 254 pozícióban szerin jelenléte elengedhetetlen a variánsokra jellemző fenotípus kialakításában. A dél-afrikai variáns törzsekkel végzett vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a variáns fenotípus akkor is kialakul, ha a 222. pozícióban alanin, a 254. pozícióban pedig aszparagin található, tehát a 222 treonin/glutamin és 254 szerin aminosavak nem kizárólagos meghatározói a variáns fenotípusnak. A III. csoportba tartozó, 2007-ből származó törzs nukleotid szekvenciája megegyezett a vizsgált régió a Delaware E törzssével, ami az előző két behurcolástól független harmadik behurcolást valószínűsít, ismeretlen forrásból. Ámbár az észak-amerikai variáns törzsekkel közeli rokonságban álló IBDV törzsek jelenlétét a Dél-afrikai Köztársaságban *Jackwood és Sommer-Wagner (2007)* már minket megelőzve publikálta, de a törzsek antigenitásbeli tulajdonságait, patogenitását és az antigénvariáns természetüket élő vírus hiányában nem tudták vizsgálni. A dél-afrikai variáns törzs patogenitási vizsgálata során megállapítottuk, hogy a Delaware E törzshöz hasonlóan képes áttörni olyan a „klasszikus” antigenitását vírusok által indukált maternális immunitást, ami megakadályozza egy klasszikus virulens vírusból készült vakcina vírus (W2512) megeredését. Sem a referens Delaware E törzs, sem pedig a dél-afrikai variáns törzs nem okozott klinikai tüneteket sem a húshibrid sem pedig a betegségre fogékonyabb szentinel SPF (tojóhibrid) csirkékben. A dél-afrikai törzs a Delaware E-hez hasonló mértékű atrófiát és azzal azonos jellegű szövettani elváltozásokat idézett elő a fertőzött állatok bursájában. Kórszövettani vizsgálat során a B limfociták folliculusokból való gyors kiürülését (deplécióját), valamint az interfollikuláris szövénnyek megvastagodását lehetett megfigyelni erős gyulladásos reakció nélkül. Ezek az elváltozások a bursa erős sorvadását okozták (a B:B index nagyon alacsony), de a betegség idült szakaszában a folliculusok jelentős részébe megkezdődött a limfociták visszatelepülése. Az állatkísérlet során végzett klinikai megfigyelések, a kórszövettani elváltozások, valamint a vírus megeredése „klasszikus” maternális immunitás jelenlétében egyértelműen azt mutatják, hogy a dél-afrikai izolátum magán viseli az antigén variáns vírusokra jellemző összes jegyet, azaz a dél-afrikai izolátum is egy antigén variáns vírus. (A dél-afrikai variáns vírusokról itt leírt eredményeket Mató, Tatár-Kis, van Heerden, Palya: Characterisation of South-African variant

infectious bursal disease virus isolates címmel az Avian Pathology laphoz beküldtük, a disszertáció beadásakor a cikk bírálat alatt áll).

A mezei izolátumokon túl **számos vakcinatörzset is jellemeztünk**. A Gumboro-betegség ellen nagyon sok és nagyon sokféle vakcina van a világon forgalomban (eredet, virulencia, sejtkultúra-adaptáltság és feltehetően antigenitás alapján is). Ez nagyon jó lehetőséget biztosít a különböző patogenitású törzsek közötti genetikai különbségek, valamint a patogenitás változásért felelőssé tehető aminosav-változások vizsgálatára. Mivel a virulenciát feltehetően a szövetadaptáltság is befolyásolja, különböző mértékben attenuált, részben sejtenyészetben, részben embrionált tyúktojásban (esetleg SPF csirkében) szaporított élővírusos vakcinákat vizsgáltunk. Sajnos sok esetben nagyon kevés információhoz sikerült hozzájutni a vakcinákról, így bizonyos vakcinák esetében a gyártó sem a törzs patotípusát (mild –erősen attenuált, intermedier-közepesen attenuált vagy intermedier plusz- gyengén attenuált), sem a vírusszaporítás közegét nem adja meg. Ezért néhány reprezentatív törzset azonos rendszerben megvizsgáltunk a vakcinavírus patogenitására (SPF csirkében), valamint a sejtenyészethez való adaptáltságra nézve (CEF). A vizsgálatot minden esetben közvetlenül az ampullából visszaoldott liofilizált vakcina vírusszuszpenzió végeztük, annak érdekében, hogy kizárjuk az eltérő közegben való szaporítás során esetlegesen fellépő változásokat, valamint a passzálás során a vakcinák más törzsekkel való szennyeződését. A vizsgált vakcinatörzsek a VP2 hipervariábilis régiójának szekvencia-analízise alapján több csoportot alkotnak.

A D78-csoportba sorolódott a klasszikus virulens törzsek megjelenése után Magyarországon elsőként forgalomba hozott két IBDV vakcina is. A *TAD Gumboro* vakcina a *Nobilis Gumboro D78* vakcina törzse megegyezik, míg a *Poulvac* két aminosavban különbözik tőle. A kettő közül az egyik a 249. pozícióban található, ami a P_{DE} hidrofíl hurkon helyezkedik el, és szerepe lehet az antigenitás befolyásolásában. Egy másik aminosav változás, amit a *Bur706* és a *Gallivac IBD* esetében figyeltünk meg a P_{BC} hidrofíl régióban elhelyezkedő 223. aminosavat érinti. Ez az aminosav csere is eredményezhet antigenitásbeli különbséget, főleg mivel az antigenitásban kitüntetett szerepet játszó 222. pozíció mellett található. Így az ebben a pozícióban található aminosav térbeli szerkezete befolyásolhatja a mellette lévő 222. aminosav hozzáférhetőségét az ellenanyagok számára és ezen keresztül az antigenitást is. A PBG98 és a Cu-1 törzsek esetén aminosav változást figyeltünk meg a szerin-gazdag heptapeptid (SWSASGS) területén is. A *Nobilis Gumboro D78* SWSAKGS szekvenciája helyett a Cu-1 törzsben SWSALGS található, ami nem okozott nagy változást a heptapeptid szerkezetében, ellenben a PBG98 esetében jellemző LWSAKGS heptapeptidben a szerinek száma eggyel csökkent. Ezt a heptapeptid régiót régebben a szerin gazdagsága miatt

ismeretlen funkciójú kötőrégióknak tartották, és mivel mind a négy szerin főleg csak virulens törzsekben található meg ezért feltételezték, hogy a virulencia kialakításában is szerepet játszhat (Heine és mtsi, 1991). Az újabb, reverz-genetikán alapuló vizsgálatok ezt az elképzelést nem erősítették meg (Mundt, 1999, Lim és mtsi, 1999).

A P2 törzsben - a PBG98 és a *Poulvac* régi vakcinatörzsekhez hasonlóan - a P_{DE} hurok 249. pozíciójában arginin van szemben a manapság elterjedt vakcinatörzsekkel (D78-as törzsek és a P2-csoport többi tagja), amelyekben ebben a pozícióban glutamin található. Érdekes módon a P2-csoportba sorolódott a *Delvax 228CT* vakcina is, amely a gyártó szerint a 228E törzs sejt kultúra-adaptált változatát tartalmazza és ezért az eredeti törzshöz képest alacsonyabb virulenciával rendelkezik. A filogenetikai adatokból látható, hogy a csökkent virulenciának nem a sejt kultúra-adaptáció lehetett az oka, hanem egy eleve alacsonyabb virulenciájú törzs. Valószínűleg a 228E vírus a szövetadaptálás során egy P2-csoportból származó törzssel kontaminálódott és ez a törzs felülnötte az eredeti vírust. Nem ez az egyetlen vakcina, ami nem a gyártó által megadott törzset tartalmazza. A 48 vizsgált vakcinatörzs közül a *Delvax 228CT*-vel együtt 10 esetben fordul elő, hogy a filogenetikai fán a törzs nem a gyártó által megadott csoportba esik. A legtöbb probléma az állítólagosan W2512 törzset tartalmazó vakcinákkal van. A *Bursa Blen*, az *Izovac Gumboro 2*, *Izovac Gumboro 3*, az *Ovejero Gumboro* esetében a gyártók a W2512-es törzset jelölték meg, mint a vakcinában található törzset. Ennek ellenére ezeknek a vakcináknak a nukleotid szekvenciája a *Nobilis Gumboro D78* vakcinatörzsével egyezett meg. A gyártók szerint szintén 2512-es törzset tartalmaznak a *Gumbox* és a *Hipragumboro* vakcinák, ezzel szemben a P2 csoport törzseivel mutatnak szoros rokonságot. A nukleotid szekvenciájuk szerint a nagyvirulenciájú törzsből attenuált BG törzssel megegyező *Winterfield 2512* és az *Avivac IBB-M* vakcinák is 2512-es törzset tartalmaznak a gyártók leírása szerint. A *Gumboral CT* esetében a gyártó a Lukert törzset adja meg a vakcinában található törzsként, ezzel szemben a vakcina a D78-csoport törzsei közé sorolódik. Ezek a törzsbesorolási problémák jelzik, hogy egy vakcinatörzs fejlesztése során, a főbb fejlesztési lépéseknél a vakcinatörzs genetikai jellemzése nélkülözhetetlen, hogy időben fény derüljön az esteleges keresztszenyeződésekre (kontaminációkra).

A W2512-csoportban a *CNN G-22* vakcina a P_{HI} hurok 317. pozíciójában szerin helyett arginin található. Ez az aminosav változás sztérikusan befolyásolhatja a mellette lévő 318. pozícióban lévő glicin ellenanyagkötő képességét, amit kiemelten fontosnak tartanak bizonyos monoklonális ellenanyagok kötődésében (Letzel és mtsi, 2007), így közvetve antigenitásbeli különbséget is okozhat ez a változás.

Az STC-csoportba tartozó *Bursa-Vac* aminosavszekvenciája megegyezik a klasszikus virulens STC törzsével. Valószínűleg a gyártó erre utalt azzal, hogy patogenitás alapján a vírust a hot (nagyon gyengén attenuált) törzsek közé sorolta. Az STC törzshöz képest az *Avimune F*-ben a 279. pozícióban aszparaginsav helyett aszparagin található. Először *Yamaguchi* és munkatársai (1996) vetették fel attenuált vírusok szekvencia összehasonlítása után, hogy ez az aminosav változás szerepet játszhat a vírus virulenciájának csökkenésében. Később *van Loon* és munkatársai (2002) helyspecifikus mutagenézissel bizonyították, hogy a 279. pozícióban lévő aszparagin egyedül nem elegendő a sejt kultúra-adaptálódáshoz. Ez utóbbi megállapítást saját eredményeink is alátámasztják, mivel az *Avimune F* vakcina nem volt képes CEF sejtenyészetben szaporodni.

A maláj „*IBD vaccine IBD UPM93*” vakcina egy aminosav különbségtől eltekintve megegyezett a referens nagyvirulenciájú törzs (UK661) aminosav szekvenciájával. Szintén egy aminosavban különbözik az UPM94/273 maláj nagyvirulenciájú izolátumtól ami csak 10%-os elhullást és erős bursa sorvadást okozott fogékony SPF csirkékben (*Hoque és mtsi, 2001*). Az IBD UPM93 vakcina fogékony csirkékbe beoltva ennél némileg nagyobb, mintegy 20% elhullást kaptunk és az összes állatban erősen sorvadott, bevérzéses bursát okozott. Összességében kijelenthetjük, hogy az IBD UPM93 törzs egy némileg csökkent patogenitású nagyvirulenciájú törzs.

A Lukert-csoportba tartozó *Bursine 2* és *Bursimune* vakcinatörzsek esetén a Lukert törzshöz képest a két aminosav különbség közül az egyik a 253. pozícióban glutamin helyett megtalálható hisztidin. Ez a P_{DE} hurok területén található hisztidin kulcsszerepet játszik a 284. pozícióban lévő treoninnal együtt az IBD vírusok sejt kultúra-adaptálódásában (*Mundt, 1999; van Loon és mtsi, 2002*).

A V877-csoportban lévő törzsek öt, illetve hat nukleotidban különböznek a csoport névadó törzsétől és ezek egyáltalában nem, illetve csak egy esetben okoztak aminosav változást. A csendes mutációk viszonylag nagy száma alapján feltételezhető, hogy e törzscsoport esetében az attenuáltság fenntartásához majdnem az összes a V877 vakcinatörzsrre jellemző aminosavra szükség van.

Összefoglalva a vakcinacsoportokra jellemző lényegesebb **genetikai különbségeket**, az alábbiakat állapítottuk meg: A D78- és P2- csoport hasonló biológiai és szerológiai tulajdonsággal rendelkezhet. Mindkét csoportnál a klasszikus virulens csoportokra jellemző 222. prolin megtalálható. Megtalálható továbbá a sejt kultúra-adaptálódásban kulcsszerepet játszó 253. hisztidin és a 284. treonin, valamint a 279. aszparagin. Az STC- és a W2512-csoport vakcinái nagyon hasonlítanak egymásra az antigenitás és a patogenitás területén is.

Mindkét csoportban megtalálható a 222. prolin, hiányoznak belőlük a sejtkultúra-adaptálódásban fontos aminosavak (helyettük 253. glutamin, 284 alanin van) valamint a 279. pozícióban is aszparaginsav található aszparagin helyett. A 228E-csoport vakcináinál a Lukert-csoporthoz hasonlóan a 222. pozícióban szerin található, ami e két csoport esetében a többi klasszikus virulens vírusból származó vakcinától eltérő antigenitást eredményez. A 228E csoportból hiányoznak sejtkultúra-adaptálódásban fontos aminosavak (253. glutamin, 284 alanin) viszont a 279. pozícióban aszparagin található. A Lukert-csoport néhány tagjában részben, másokban teljesen megtalálhatók sejtkultúra-adaptálódásért felelős aminosavak. A 279. pozícióban igaz, hogy itt aszparaginsavat találunk, de a közvetlenül mellette lévő pozícióban alanin helyett szerin van, ami sztérikusan befolyásolhatja az aszparaginsav működését, így téve attenuálttá a csoport törzseit. Az MB-csoportba tartozó törzsek magukon viselik a nagyvirulenciájú törzsekre jellemzőnek tartott összes aminosavat: 222. alanin, 256. izoleucin, 294. izoleucin és 299. szerin (*Eterradossi és mtsi, 1999*). Ezentúl nem tartalmazzák a sejtkultúra-adaptálódásban szerepet játszó aminosavakat sem (helyettük a 253. poz. glutamin, 284. poz. alanin van). Ez alól a BG törzs kivétel, mivel benne az egyik sejtkultúra-adaptáltsági marker, a 284 treonin megtalálható. Tartalmazzák viszont a 279. pozícióban lévő aszparagint. A V877-csoportra szintén jellemző a klasszikus virulens törzsekből készített vakcináknál található 222. prolin, viszont hiányoznak a sejtkultúra-adaptálódási markerek (helyettük itt is 253. glutamin, 284 alanin van), a 279 pozícióban pedig aszparaginsav vagy aszparagin helyett glicin található. Az ausztrál vakcinavírusok már eleve alacsony patogenitású izolátumokból származnak, de ennek az alacsony patogenitásnak az okát nem ismerjük. A többi vakcinacsoport közül is van néhány, amelyek tagjai alacsony patogenitásának genetikai okát jelenleg még nem ismerjük. Ilyen például a 228E vagy a W2512 csoport amelyek esetében a vakcina fejlesztéshez használt kiindulási törzseket sem ismerjük. Nem zárható ki, hogy ezek a törzsek az ausztrál törzsekhez hasonlóan esetleg a természetben már eleve alacsonyabb patogenitással rendelkeztek, az alacsony patogenitásuk genetikai hátterét, ezekben az esetekben sem ismerjük. Az alacsony patogenitású törzsek természetes kialakulásának a jelenben is tanúi vagyunk, hiszen már a viszonylag fiatal csoport, a nagyvirulenciájú törzsek esetében is leírtak természetből izolált alacsonyabb patogenitású törzseket (lásd UPM94/273 törzs)(*Hoque és mtsi, 2001*).

A sejtkultúra-adaptálódási vizsgálataink megerősítették a reverzgenetikai vizsgálatok során kimutatott összefüggést, miszerint csak azok a törzsek képesek nem-limfoid sejtenyésztetben szaporodni, amelyekben a 253. pozícióban hisztidin és a 284. pozícióban treonin található (*Mundt, 1999; van Loon és mtsi, 2002*). Ilyenek voltak a D78-, a P2-csoport törzsei és a

Bursine 2 vakcinatörzs. Az eredendően ilyen aminosavakkal nem rendelkező törzsek esetében, mint az általunk vizsgált 228E és MB vakcinatörzs, az első leoltást követően tapasztalt sejtkultúra-adaptációt az RNS vírusokra jellemző kvázispecies magyarázhatja. Azaz, az eredeti vírusszuspenzióban, igaz csak nagyon kis mennyiségben, de jelen voltak a sejtkultúra-adaptálódott vírusrészekék is, majd a sejtenyésztetre leoltva ezek felülnőtték az eredeti víruspopulációt. Hasonló eredményre jutottunk a Lukert-törzssel megegyező szekvenciájú *Bursi-Vac* esetében is, ahol a sejtkultúrára oltás után az elméletileg szükséges egyetlen 253. glutamin→hisztidin cserén túl (mivel már a 284. treonin jelen volt) a 258. pozícióban is bekövetkezett egy aszparagin→aszparaginsav változás. Ezzel a sejtkultúra adaptált vírus szekvenciája gyakorlatilag megegyezik a Bursine2 vakcinatörzsével. A 258. aminosav pozíció szerepét a sejtkultúra-adaptálódásban eddig még senki nem írta le. Ez az eredmény azért is érdekes, mert megfigyeléseink szerint az ilyen egy-lépéses adaptálódás során csak a nem-limfoid sejtekbe való bejutáshoz szükséges aminosavak módosultak, a többi változatlan maradt. Ez azt sugallja, hogy a Lukert-törzs sejtkultúra-adaptációjához a 258. aszparaginsav is elengedhetetlen. Ez a törzscsoport filogenetikailag távol helyezkedik el azoktól a törzsektől, melyek sejtkultúra-adaptálódását helyspecifikus mutagenézissel vizsgálták (variáns, nagyvirulenciájú törzsek). A sejtkultúra-adaptált törzsekben a 258. pozícióban glicin található. Ezzel szemben a Lukert törzsben, a 258 pozícióban a glicinnél jóval hosszabb oldallánccal rendelkező aszparagin található. Ez a pozíció közel helyezkedik el a P_{DE} hurokhoz, amin a sejtkultúra-adaptálódásért felelős 253-as pozíció is található. Elképzelhető tehát, hogy a Lukert törzs esetén megfigyelt glicin→aszparagin átalakulás a 253-as pozíciótól függetlenül is megnehezíti a vírus kapcsolódását a nem-limfoid sejtek receptorához. A sejtkultúrához való adaptálódás során az aszparagin aszparaginsav átalakulás valahogy ellensúlyozhatja ezt a hatást, és így lehetővé teszi a vírus számára, hogy a 253 hisztidin és 284 treonin segítségével bejusson a nem-limfoid sejtekbe is.

A természetes körülmények között revertálódott vírusizolátumok vizsgálata alapján a nem-limfoid sejtkultúrához adaptált vakcinatörzsek csirkében, azaz limfoid sejtekben passzálódva elveszíthetik sejtkultúra-adaptálódási markereik egy részét. Ilyen a 253 hisztidin, ami helyett több esetben glutamint találtunk a csirkéből visszaizolált törzsekben. Amennyiben ezeket a törzseket újra nem-limfoid sejtekben passzáljuk visszanyerik a 253. hisztidint. Ez valószínűleg úgy lehetséges, hogy a vakcinavírus kvázispeciesben már eleve megtalálható a nem-limfoid sejtekben gyengébben (hiszen megmaradt benne 284 treonin), de limfoid szöveteken jobban szaporodó víruspopuláció. Amikor a vírust nem-limfoid sejtekben szaporítjuk akkor a 253 hisztidint tartalmazó víruspopuláció erősödik meg. Mikor pedig a

vírust limfoid sejtekben szaporítjuk akkor a 253. glutamint tartalmazó pouláció kerül túlsúlyba. Az erőteljesebb szaporodás a limfoid sejtekben egyúttal a bursa súlyosabb károsodását, és végső soron a vírus virulenciájának fokozódását jelenti. Tehát megállapíthatjuk, hogy a 253. pozícióban lévő hisztidin glutaminra cserélődése a vírus patogenitásának fokozódásával jár.

A vakcinacsoportok patogenitási szintjének megállapításához minden, a filogenetikai vizsgálat eredménye alapján elkülönülő vakcinacsoportból 1-1 törzset vizsgáltunk, melyek a bursakárosító hatás alapján 3 patotípusba sorolhatók:

- Mild (erősen attenuált): enye bursakárosodás, B:B index>0,5, törzs csoportok: P2, Lukert; immunválasz: lassan alakul ki a teljes szero-pozitivitás.
- Intermedier (közepesen attenuált): közepes bursakárosodás, B:B index>0,3, Törzs csoport: D78; immunválasz: lassan alakul ki.
- Intermedier plusz (gyengén attenuált): súlyosabb bursakárosodás, B:B index <0,3 (akár 0,15 is lehet); Törzscsoportok: 228E, STC, W2512, MB, V877
immunválasz: általánosságban gyorsan alakul ki (már 7. napra minden állat pozitív, kivétel 228E).

A szerológiai eredményekben tapasztalt jelentős különbség (főképpen az intermedier plusz csoportban) felveti annak lehetőségét, hogy a vizsgált vakcinák között akár jelentős antigenitásbeli különbség is lehet. Ez különösen valószínűnek látszik a 228E-csoport és a klasszikus virulens vírusokból készített vakcinák csoportjai között (pl. D78-csoport -amibe a neutralizáló vírusként használt GP82 törzs is tartozik-, valamint STC-csoport). A 228E vakcina esetében ugyanis, már a vakcinázást követő 7. napon sorvadt bursát találtunk a kórbonctani vizsgálat során, ennek ellenére a vírusneutralizációs vizsgálatban a savók negatívnak vagy gyengén pozitívnak bizonyultak az elért maximum VN titer nagyon alacsony a hasonló bursa károsító hatású törzsekhez mérten, ugyanakkor ELISA vizsgálat alapján mindegyik savó erősen pozitív eredményt adott. A vakcinák VP2 struktúrfehérjéjének hipervariábilis régióját alkotó aminosavak szekvenciájának összehasonlítása során alapján a 228E és a többi klasszikus virulens eredetű vakcina törzs (D78, STC) között lényeges különbséget találtunk a 222-es pozícióban, ahol a klasszikus törzsekben prolin a 228E törzsben viszont szerin aminosav található. Ez a változás monoklonális ellenanyagokkal végzett vizsgálatok alapján (*Letzel és mtsi, 2007*) jelentősen befolyásolja bizonyos ellenanyagok kötődését, azaz szerológiai különbségekhez is vezethet. Hasonló antigenitásbeli különbséget észleltünk a Lukert-csoport törzseinél (ahol a 222. pozícióban szintén szerin található), valamint az MB törzs esetében (ahol a nagyvirulenciájú törzsekre jellemző alanin

található ebben a pozícióban). Ez utóbbi eredmény összhangban van *Etterdossi* és munkatársai (1997) által végzett vizsgálatokkal, ahol meg állapították, hogy bizonyos monoklonális ellenanyagok nem képesek a nagyvirulenciájú törzsekhez kötődni. Ők ezért az antigenitásbeli különbségért a 222. pozícióban lévő alanint tették felelőssé. A vakcinacsoportok patogenitásának molekuláris biológiai hátterére vonatkozóan megállapíthatjuk, hogy a legalacsonyabb patogenitással (mild és intermedier patogenitási csoportok) azok a vakcinák rendelkeznek, amelyekben a 279. aszparaginon túl a sejtkultúra-adaptálódásért felelős aminosavak is jelen vannak (D78-, P2-csoportok). Ez alól csak a Lukert-csoportba tartozó Poulvac Bursine 2 vakcina képez kivételt, ahol a sejtkultúra-adaptálódásért felelős aminosavak jelen voltak ugyan, de 279. pozícióban a kevésbé attenuált törzsekre jellemző aszparaginsav található. Igaz közvetlenül mellette a más vakcinatörzsekre jellemző alanin helyett szerin található, amely az aszparaginsav hatását esetleg el tudja nyomni. A magasabb patogenitással rendelkező törzsek esetében (intermedier plusz patogenitási csoport) a sejtkultúra-adaptálódásért felelős aminosavak hiányoznak, de a 279. pozícióban vagy az aszparagin (228E, MB és Avimune F) vagy a glicin (V877-csoport) található. Kivételt képez a W2512-es csoport, ahol a 279. pozícióban aszparaginsavat találunk. Erre a csoportra egyetlen egyedi aminosav változás jellemző, a 217. pozícióban szerin helyett leucin, ami közvetlenül a P_{BC} hidrofíl régió mellett található. Lehetséges, hogy a hidrofíl hurok melletti két szerin egyikének lecserélése hidrofób aminosavra megváltoztatja a hurok térbeli szerkezetét és végső soron, ez vezet a W2512-es törzs a klasszikus virulens vírusokhoz képest csökkent virulenciájához.

A kapott eredmények alapján a továbbiakban tervezzük a vakcinacsoportok közötti szerológiai viszonyok vizsgálatát is keresztneutalizációs vizsgálatban (elsőként a 228E, D78, P2 és MB törzsek között, melyekből sejtkultúra-adaptált törzs is rendelkezésünkre áll), valamint a 228E és MB törzsek eredeti és sejtkultúra-adaptált formájának patogenitásának összehasonlítását SPF csirkékben.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr Lomnizci Bélának a munkám során nyújtott szakmai irányításért, gyakorlati tanácsaiért és a dolgozattal kapcsolatos kritikai észrevételeiért. Külön köszönet illeti meg Dr Palya Vilmost, a rengeteg szakmai segítésért, a nagyon hasznos szakmai tanácsaiért és mert a legmesszebbmenőig támogatott céljaim megvalósításában. Továbbá hálával tartozom Dr Süveges Tibornak a szövettani minták értékeléséért, Fodor Editnek szerológiai munkában nyújtott segítségéért, valamint Tábi Andreának és Lénárd Magdolnának a molekuláris biológiai vizsgálatokban nyújtott technikai segítésért. Végül, de nem utolsó sorban feleségemnek, Tatár-Kis Tímeának aki nemcsak a nyugott környezetet teremtette meg a dolgozat elkészítéséhez, hanem nagyon hasznos tanácsokkal látott el és rengeteg szakmai segítséget nyújtott számomra.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A csirkék fertőző bursitise (infectious bursal disease, IBD), a fiatal csirkék nagy terjedő képességű, immunosuppresszióval járó vírusos betegsége, ami jelentős gazdasági kárt okoz a baromfityényszótknek világszerte.

A betegség molekuláris diagnosztikájára alkalmas RT-nested PCR rendszert, valamint a fertőző bursitis vírus (IBDV) törzsek gyors elkülönítésére „szolgáló” restrikciós endonukleázokon alapuló vizsgálati módszert dolgoztunk ki. A vírusgenom legváltozékonyabb szakaszának (VP2 hipervariábilis régió) szekvenciája alapján vizsgáltuk a törzsek filogenetikai viszonyát. A törzscsoportok közti aminosav különbségek elemzése lehetőséget nyújtott az egyes aminosavak virulenciában, illetve sejt kultúra-aptáltságban játszott szerepének vizsgálatára. Szekvencia-analízissel jellemeztük az első magyarországi, klinikai tüneteket okozó IBDV izolátumot. Megállapítottuk, hogy az európai „klasszikus virulens” törzsek egyetlen törzs leszármazottai lehetnek, amelyek egyetlen behurcolás után terjedtek szét Európában. Jellemeztük a '77-81 között Magyarországon izolált, klinikai tüneteket nem okozó, ún. szubklinikai törzseket. Megállapítottuk, hogy ezek a törzsek a korai lengyel törzsekkel együtt az IBD vírusokon belül szerológiailag is megkülönböztethető, korábban nem azonosított, önálló csoportot alkotnak. Ilyen „szubklinikai” törzsek lehettek az első IBD vírusok Európában, még a betegség első európai leírását megelőzően. Később a virulensebb törzsek kiszorították őket Európából, ugyanakkor az amerikai kontinensen a mai napig is fennmaradtak. A 80-as évek második felében Nyugat-Európában megjelent „nagyvirulenciájú” IBDV törzsek Magyarországra több behurcolás során jutottak és nagyon gyorsan elterjedtek. A többszöri behurcolást az 1995-2008 közötti gyűjtött minták genetikai vizsgálatával igazoltunk. Elsőként bizonyítottuk a „variáns” törzsek jelenlétét Dél-Afrikában (szerológiai és patogenitási vizsgálattal is), melyek feltehetően Kanadából származnak. Jellemeztünk számos vakcinát, genetikai alapon vizsgáltuk a vakcinacsoportok egymáshoz való viszonyát. A klinikai vizsgálat eredménye alapján feltételezzük bizonyos vakcinacsoportok között antigenitásbeli különbségek jelenlétét, melynek molekuláris hátterét elemeztük. Eredményeink megerősítették, hogy az általánosan elfogadott sejt kultúra-adaptáltsági markerek (H^{253} és T^{284}) jelenléte valóban a vakcina adaptáltságát jelzi. Ugyanakkor több IBDV vakcina esetében - a kvázispecies jellegre visszavezethetően -, ezen markerek megjelenésével kísért, gyors adaptálódást is tapasztaltunk. Bizonyítottuk, hogy a 253. aminosav megváltozása nemcsak sejt kultúra-adaptálódás, hanem *in vivo* alkalmazás során is könnyen bekövetkezik ellenkező irányban. Az attenuáltságban a H^{253} és N^{279} egyaránt fontos; előbbi Q^{253} -ra reverálódva virulencia fokozódást eredményez, utóbbi minden olyan csoportra („szubklinikai”, „variáns”, és attenuált) jellemző, amely klinikai tüneteket nem okoz (sejt kultúra-adaptáltságtól függetlenül). A dél-afrikai és kanadai „variáns” csoport vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a korábban leírt 222. és 254. aminosav pozíció nem alkalmas a „variáns” fenotípus egyértelmű azonosítására.

8. SUMMARY

Infectious bursal disease (IBD) is a highly contagious immunosuppressive disease of young poultry, causing great economic losses to the poultry industry worldwide.

Reverse transcription followed by nested PCR suitable for molecular diagnosis of IBD, and a restriction enzyme based test method for rapid differentiation of infectious bursal disease virus (IBDV) strains were developed. To investigate the genetic relationship among the IBDV strains, phylogenetic analysis was performed. The importance of different amino acid changes in the VP2 hypervariable region in the adaptation to non-lymphoid cells and the influence on virulence were also studied. The first Hungarian IBDV strain obtained from clinical case of the disease was characterized. It was concluded, that all European “classical virulent” strains were most probably the descendants of one strain, which became widespread in the continent. Strains isolated from subclinical cases in Hungary during the period of ’77-81 were also characterized. These strains -along with early Polish IBDV strains- constituted a previously unidentified, antigenically distinct group of IBD viruses. These “so-called” subclinical strains, which could be the early IBD viruses in Europe, were later replaced by more virulent strains in Europe, but they are still present in the American continent. The “very virulent” strains which emerged in the late ‘80 were introduced to Hungary repeatedly as it has been shown by the phylogenetic analysis of field samples from the period of 1995-2008. The occurrence of different “variant” IBDV strains in South-Africa was demonstrated. The finding based on genetic analysis of the isolates was confirmed by serological and pathological examinations and the possible source of introductions was identified. Several vaccines were characterized; their genetic relationship to each other was tested. The genetic basis of the difference in biological characteristics between certain groups of vaccines was investigated. Vaccine groups possessing markers of cell-culture adaptation ((H253 and T284) were found to be cell-culture adapted. The appearance of the cell-culture adaptation markers was observed if a vaccine became adapted very quickly. This phenomenon could be explained by the quasi species feature of IBDV. Change of amino acid at position 253 could be achieved not only by cell-culture adaptation, but - to the opposite direction - also during in vivo replication of the vaccines in chickens. Important role of H²⁵³ and N²⁷⁹ in attenuation was verified; reversion of the former to Q²⁵³ manifested in increased virulence. N²⁷⁹ is characteristic to all “subclinical”, “variant” and attenuated strains, regardless they are cell-culture adapted or not. Amino acids at positions 222 and 254 which were previously reported as characteristic to all variant strains were not found in the Canadian and South-African variant strains.

9. FELHASZNÁLT IRODALOM

- Azad, A.A., Jagadish, M.N., Brown, M.A. & Hudson, P.J.** (1987). Deletions mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of birnavirus. *Virology*, 161, 145-152.
- Ashraf, S., Tang, Y. & Saif, Y.N.** (2007). Development of differential RT-PCR assays and molecular characterization of the complete VP1 gene of five strains of very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*, 51, 935-941.
- Boot, H.J., ter Huurne, A.A.H.M., Hoekman, A.J.W., Peeters, B.P.H. & Gielkens, A.L.J.** (2000). Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. *Journal of Virology*, 74, 6701-6711.
- Boot, H.J., ter Huurne, A.A.H.M., Hoekman, A.J.W., Pol, J.M., Gielkens, A.L.J. & Peeters, B.P.H.** (2002). Exchange of the C-terminal part of VP3 from very virulent infectious bursal disease virus results in an attenuated virus with a unique antigenic structure. *Journal of Virology*, 76, 10346-10355.
- Boot, H.J., Hoekman, A.J.W. & Gielkens, A.L.J.** (2005). The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B-segment. *Archives of Virology*, 150, 137-144.
- Brandt, M., Yao, K., Liu, M., Heckert, R.A. & Vakharia, V.N.** (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 75, 11974-11982.
- Brown, M.D., Green, P. & Skinner, M.A.** (1994). VP2 sequences of recent European "very virulent" isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of "classical" strains. *Journal of General Virology*, 75, 675-680.
- Bygrave, A.C. & Faragher, J.T.** (1970). Mortality associated with Gumboro disease. *Veterinary Record*, 86, 758-759.
- Cao, Y.C., Yeung, W.S., Law, M., Bi, Y.Z., Leung, F.C. & Lim, B.L.** (1998). Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variant strains. *Avian Diseases* 42:340-351.
- Campbell, G.** (2001). Investigation into evidence of exposure to infectious bursal disease virus in wild birds in Ireland. *Proceedings II International Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia, Rauischholzhausen*, 230-235.

- Chettle, N.J., Stuart, J.C. & Wyeth, P.J.** (1989). Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Veterinary Record*, 125, 271-272.
- Chevallier, C., Lepault, J., Erk, I., Da Costa, B. & Delmas, B.** (2002). The maturation process of VP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *Journal of Virology*, 76, 2384-2392.
- Coulibaly, F., Chevallier, C., Gutsche, I., Pous, J., Navaza, J., Bressanelli, S., Delmas, B. & Rey, F.A.** (2005). The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 120, 761-772.
- Cosgrove, A.S.** (1962). An apparently new disease of chickens-avian nephrosis. *Avian Diseases*, 6, 385-389.
- Di Fabio, J., Rossini, L.I., Etteradossi, N., Toquin, D. & Gardin, J.** (1999). European-like pathogenic infectious bursal disease viruses in Brasil. *Veterinary Record*, 145, 203-204.
- Dobos, P., Hill, B.J., Hallett, R., Kells, D.T., Becht, H. & Teninges, D.** (1979). Biophysical and biochemical characterisation of five animal viruses with bisegmented double-stranded RNA genomes. *Journal of Virology*, 32, 593-605.
- Etteradossi, N., Rivallan, G., Toquin, D. & Guittet, M.** (1997). Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. *Archives of Virology*, 142, 2079-2087.
- Etteradossi, N., Arnauld, C., Tekaiia, F., Toquin, D., Le Coq, H., Rivallan, G., Guittet, M., Domenech, J. van den Berg, T.P. & Skinner, M.A.** (1999). Antigenic and genetic relationship between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West-African isolate. *Avian Pathology*, 28, 36-46.
- Fahey, K.J., Erny, K. & Crooks, J.** (1989). A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus neutralizing antibodies that passively protect chickens, *Journal of General Virology*, 70, 1473-1481.
- Gao, H.L., Wang, X.M., Gao, Y.L. & Fu, C.Y.** (2007) Direct evidence of reassortment and mutant spectrum analysis of a very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Diseases*, 51, 893-899.
- Granzow, H., Birghan, C., Mettenleiter, T. C., Beyer, J., Köllner, B., Mundt, E.** (1997) A Second Form of Infectious Bursal Disease Virus-Associated Tubule Contains VP4. *Journal of Virology* 71(11) 8879-8885.
- Heine, H.G., Haritou, M., Failla, P., Fahey, K. & Azad, A.** (1991). Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal

- disease virus which can circumvent vaccination with standard type 1 strains. *Journal of General Virology*, 72, 1835-1843.
- Hoque, M.M., Omar, A.R., Chong, L.K., Hair-Bejo, M. & Aini, I.** (2001). Pathogenicity of SspI-positive infectious bursal disease virus and molecular characterisation of the VP2 hypervariable region. *Avian Pathology*, 30, 369-380.
- Hudson, P.J., McKern, N.M., Power, B.E. & Azad, A.A.** (1986). Genomic structure of the large RNA segment of infectious bursal disease virus. *Nucleic Acid Research*, 14, 5001-5012.
- Ikuta, N., El-Attrache, J., Villegas, P., Gracia, M., Lunge, V.R., Fonseca, A.S.K., Oliveira, C. & Marques, E.K.** (2001). Molecular characterization of Brazilian infectious bursal disease viruses. *Avian Diseases*, 45, 297-306.
- Islam, M.R., Zierenberg, K. & Müller, H.** (2001). The genomsegment B encoding the RNA-dependent RNA polymerase protein VP1 of very virulent infectious bursal disease virus (IBDV) is phylogenetically distinct from that of all other IBDV strains. *Archives of Virology*, 146, 2481-2492.
- Ismail, N.M, Saif, Y.M & Moorhead, P.D.** (1988). Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chicken. *Avian Diseases*, 38, 531-537.
- Ismail, N.M, Saif, Y.M, Wigle, W.L., Havenstein, G.B & Jackson, C.** (1990). Infectious bursal disease virus variant from commercial leghorn pullets. *Avian Diseases*, 34, 141-145.
- Jackwood, D.J., Cookson, K.C, Sommer-Wagner, S.E., Le Galiudec, H., & de Wit, J.J.** (2006). Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Diseases*, 50, 532-536
- Jackwood, D.J. & Jackwood, R. J.** (1994). Infectious bursal disease viruses: molecular differentiations of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. *Avian Diseases*, 38, 531-537.
- Jackwood, D.J. & Sommer, S.E.** (1998). Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses detected in commercially reared chickens. *Avian Diseases*, 42, 321-339.
- Jackwood, D.J. & Sommer-Wagner, S.E.** (2005). Molecular epidemiology of bursal disease viruses: distribution and genetic analysis of newly emerging viruses in the United States. *Avian Diseases*, 49, 220-226.
- Jackwood, D.J. & Sommer-Wagner, S.** (2007). Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. *Virology*, 365, 369-375.

- Jackwood, D.J. , Sommer, S.E. & Knoblich, H.V.**(2001). Amino acid comparison of infectious bursal disease viruses placed in the same or different molecular csoports by RT/PCR-RFLP. *Avian Diseases*, 45, 330-339.
- Lee, C.C., Ko, T.P., Chou, C.C., Yoshimura, M., Doong, S.R., Wang, M.Y. & Wang, A.H.** (2006).Crystal structure of infectious bursal disease virus VP2 subviral particle at 2.6 Å resolution: implication in virion assembly and immunogenicity. *Journal of Structural Biology*, 155, 74-86.
- Le Nouën, C., Rivallan, G., Toquin, D.,Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y. & Eterradosi, N.** (2006). Very virulent infectious bursal diseasae virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *Journal of General Virology*, 87, 209-216.
- Letzel, T., Coulibaly, F., Rey, F.A., Delmas, B., Jagt, E., van Loon, A.A.M.W. & Mundt, E.** (2007). Molecular and structural bases for antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 81, 12827-12835.
- Lim, B.L., Cao, Y., Yu, T. & Mo, C.W.** (1999). Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblast by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2. *Journal of Virology*, 73, 2854-2862.
- Lin, Z., Kato, A., Otaki, Y., Nakamura, T., Sasmaz, E. & Ueda, S.** (1993). Sequence comparisons of highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Diseases*, 37, 315-323.
- Liu, H.J., Giambrone, J. J. & Dormitorio, T.** (1994). Detection of genetic variations in serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Journal of Virological Methods*, 48, 281-291.
- Liu, J., Zhou, J. & Kwang, J.** (2002). Antigenic and molecular characterization of recent infectious bursal disease virus isolates in China. *Virus Genes*, 24, 135-147.
- Liu, M. & Vakharia, V.N.** (2004). VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology*, 33, 62-73.
- Lombardo, E., Maraver, A., Cast, J.R., Rivera, J., Fernandez-Arias, A., Serrano, A., Carrascosa, J.L. & Rodriguez, J.F.** (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *Journal of Virology*, 73, 6973-6983.

- Lombardo, E., Maraver, A., Espinosa, I., Fernandez-Arias, A. & Rodriguez, J.F.** (2000). VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*, 277, 345-357.
- Lucio, B. & Hitchner S. B.** (1979) Infectious Bursal Disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny. *Avian Diseases*, 23, 466-478.
- Mundt, E., Kollner, B. & Kretzschmar, D.** (1997). VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *Journal of Virology*, 71, 5647-5651
- Mundt, E.** (1999). Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *Journal of General Virology*, 80, 2067-2076.
- Müller, H. & Nitschke, R.** (1987). The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein. *Virology*, 159, 174-177.
- Nunoya, T., Otaki, Y., Tajima, M., Hiraga, M. & Saito, T.** (1992) Occurrence of acute infectious bursal disease with high mortality in Japan and pathogenicity of field isolates in SPF chicken. *Avian Diseases*, 36, 597-609.
- Ojkic, D., Martin, E., Swinton, J., Binnington, B. & Brash, M.** (2007). Genotyping of Canadian field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Pathology*, 36, 427-433.
- Palya V., Rátz F., Vajda G. és Markos B.** (1981). A baromfi fertőző bursitis (Gumboro betegség) II. A betegség hazai megállapítása. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 36, 75-85.
- Remorini, P., Calderón, M.G., Aguirre, S. Periolo, O., La Ttotre, J. & Mattion, N.** (2006). Characterisation of infectious bursal disease viruses from Argentina. *Avian Diseases*, 50, 245-251.
- Sapats, S.I. & Ignjatovic, J.** (2000). Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Archives of Virology* 145, 773-785.
- Schat, K. A. & Purchase, H. G.** (1998). Cell-culture methods *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. 4th edition, American Association of Avian Pathologists, USA, 223-234.
- Sharma, J.M., Dohms, J.E. & Metz, A.L.** (1989). Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of specific-pathogen-free chickens. *Avian Diseases* 33, 112-124.

- Sanchez, A.B. & Rodríguez, J.F.** (1999). Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*, 262, 190-199.
- Snyder, D.B., Vakharia, V.N. & Savage, P.K.** (1992). Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Archives of Virology*, 127, 89-101.
- Spies, U., Müller, H. & Brecht, H.** (1987). Properties of RNA polymerase activity associated with infectious bursal disease virus and characterization of its reaction products. *Virus Research*, 8, 127-140.
- Spies, U. & Müller, H.** (1990). Demonstration of enzyme activities required for cap structure formation in infectious bursal disease virus, a member of the Birnavirus csoprt. *Journal of General Virology*, 71, 977-981.
- Tacken, M.G.J, Peeters, B.P.H, Thomas, A.A.M., Rottier, P.J.M. & Boot, H.J.** (2002). Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *Journal of Virology*, 76, 11301-11311.
- van den Berg, T.P., Gonze, M. & Meulemans, G.** (1991) Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterisation a highly virulent strain. *Avian Pathology*, 20, 133-143.
- van de Peer, Y. & De Wachter, R.** (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the MS Windows environment. *Computer Applications in the Biosciences*, 10, 569-570.
- van Loon, A.A.W.M., de Haas, N., Zeyda, I. & Mundt, E.** (2002). Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *Journal of General Virology*, 83, 121-129.
- Villegas, P.** (1998). Titration of biological suspensions *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. 4th edition, American Association of Avian Pathologists, USA, 248-254.
- Wang, Y.S., Wang, Z.C., Tang, Y.D., Shi, Z.L., He, K.W., Li, Y., Hou, J.B., Yao, H.C., Fan, H.J. & Lu, C.P.** (2007). Comparison of four infectious bursal disease viruses isolated from different bird species. *Archives of Virology*, 152, 1787-1797.
- Yamaguchi, T., Ogawa, M., Inoshima, Y., Miyoshi, M., Fukushi, H. & Hirai, K.** (1996). Identification of sequence changes responsible for attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology*, 223, 219-223.

- Yao, K., Goodwin, M.A. & Vakharia, V.N. (1998)** Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *Journal of Virology*, 72, 2647-2654.
- Yao, K. & Vakharia, V.N. (2001)** Induction of apoptosis in vitro by the 17-kDa nonstructural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. *Virology*, 285, 50-58.
- Zierenberg, K., Nieper, H., van den Berg, T.P., Ezeokoli, C.D., Voß, M. & Müller, H. (2000).** The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, “classical” virulent and attenuated tissue culture adapted strains. *Archives of Virology*, 145, 113-125.
- Zierenberg, K., Raue, R. & Müller, H. (2001).** Rapid identification of “very virulent” strains of infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathology*, 30, 55-62.

10. A TÉMÁHOZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Referált tudományos folyóiratban megjelent dolgozatok:

Ivan J, Velhner M, Ursu K, German P, Mato T, Dren CN, Meszaros J. (2005). Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Veterinary Research. Apr, 69(2)*,135-42.

K. Domanska, T. Mato, G. Rivallan, K. Smietanka, Z. Minta, C. de Boisseson, D. Toquin, B. Lomniczi, V. Palya, N. Etteradossi (2004). Antigenic and genetic diversity of early European isolates of Infectious bursal disease virus prior to the emergence of the very virulent viruses: early European epidemiology of Infectious bursal disease virus revisited? *Archives of Virology 149(3)*: 465-80. *(megosztott elsőszervezős cikk)*

Konferencia kiadvánvok:

T. Mato., B. Lomniczi, V. Palya (2004) Molecular characterisation of Hungarian field isolates and vaccinal infectious bursal disease virus strains World's Poultry Congress & Exhibition Istanbul Turkey Fulltext CD

V. Palya T. Mato. (2004) Molecular csoporting of current live infectious bursal disease vaccines. COST 839 Agriculture & Biotechnology, Immunosuppressive viral diseases of poultry, Final meeting, Barcelona

T. Mató, V. Palya and B. Lomniczi (2001) Molecular Characterisation of Hungarian field isolates and vaccinal infectious bursal disease virus strains. II International Symposium of Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious Anaemia, Rauschholzhausen Germany Proceedings p172

11. FÜGGELÉK

A DOLGOZATBAN FELHASZNÁLT IBDV TÖRZSEK GENBANK-I AZONOSÍTÓI

Klasszikus virulens törzsek: STC (D00499), 52/70 (AY321953), Cu1-wt (AY321952), CJ801cef (AF006694), CJ801 (AF006694).

Variáns törzsek: 3212 (AF091097), GLS (AY368653), Var A (M64285), Del E (Var E) (D10065), U28 (AF091099), T1 (AF281238), 43 (AF281223), 404 (AF281224), NC171 (AF780331), 06-45600 (EF139015), 06-31922 (EF139032), 04-40294 (EF139035), 05-23779 (EF139016), 03-36960 (EF139055), 04-14627 (EF139048), 03-11132 (EF139081), 05-40611-2 (EF139045), 02-34396 (EF139022), 03-11133 (EF139022), 05-48397-4 (EF139068), 04-34302-5 (EF139062), 03-59467 (EF139047), 03-25355 (EF139060), 06-38097 (EF139027), 05SA8 (DQ916225), 05SA10 (DQ916224).

Vakcinák: Lukert BP (AY918948), MB (AF457103), 228E (AJ586966), 228ETW (AF457104) Cu1 (X16107), W2512 (AF457105), D78 (Y14962), Bursine2 (Y14960), P2 (X84035), PBG98 (D00868), Bursa Vac (AF148075), Bursine Plus (AF281231), Univax BD (AF076236), 00273 (AF148073), V877/K (AF148074).

Szubklinikai törzsek: S002 (AM084688), S003 (AM084689), G02BR (AF293787), G07BR (AF293775), G11BR (AF293776), G48BR (AF293779), G52BR (AF293780), G67BR (AF293781), G68BR (AF293782), G71BR (AF293783), G72BR (AF293784), G75BR (AF293785), G79BR (AF293786), H2 (AF281234), RF-8/96 (Z97013), 02-30850 (EF138963), 586US (AF305739), 97-40404 (EF138965), 99-40498 (EF138975), 04-18871 (EF138966), 05-13444 (EF138961), 02-17300 (EF138962), 06-108190 (EF138971), 05-46700 (EF138964), 05-47327 (EF138974), 03-57452 (EF138986), 03-42857 (EF138979), 03-44566 (EF138970), 06-51480 (EF138952), 05-32114 (EF138992), 06-48564 (EF138949), 03-41152 (EF138987), 03-57450 (EF138993), 06-51480 (EF138951).

Nagyvirulenciájú törzsek: DV86 (D16630), 849VB (AY321949), 96108 (AY321950), UK661 (X92760), UPM94/273 (AF248612), UPM92 (AF262030), UPM97 (AF247006), N4/NG (AF159207), N9/NG (AF159211), K280/89ZA (AF159217), K357/88DE (AF159216), YV (AF413076), LX (AF416624), NC (AF416623), HD96 (AF076226), HB97 (AF413073), 88180 (AJ001941), 89163 (Y14956), 91168 (Y14957), 91247 (AJ001944), 94432 (Y14955), 96108 (AJ001948), 95072 (AJ001946), OKYM (D49706), OKYMT (D83985).